

L1-CAM – ein Tumormarker für das Kolorektale Karzinom?

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Annekatrin Schulze
geb. am 04.09.1982 in Dresden

angefertigt an der: Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie
Universität Leipzig
Liebigstraße 20a, 04103 Leipzig
Leiter: Prof. Dr. med. Martin Lacher

Betreuer: Prof. Dr. med. Ulf Bühligen
Dr. med. Robin Wachowiak

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.11.2016

Bibliographische Beschreibung	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einführung	5
2. Grundlagen	7
3. Material und Methoden	12
3.1. Patientengut	12
3.2. Immunhistochemische Färbung des Primärtumors von L1-CAM und Beurteilung der Expression	13
3.3. Bestimmung der Serumkonzentrationen von L1-CAM und CEA	16
3.3.1. Bestimmung der Serum-Konzentration von L1-CAM mittels ELISA	16
3.3.2. Bestimmung der Serum-Konzentration von CEA mittels ELISA	16
3.4. Statistik	17
4. Ergebnisse	18
4.1. L1- CAM Immunhistochemie des Primärtumors	18
4.1.1. L1-CAM Expression in Bezug auf Alter und Geschlecht sowie BMI	18
4.1.2. L1-CAM Expression entsprechend der Ausdehnung des Primärtumors	20
4.1.3. L1-CAM Expression und Lymphknoten- sowie Fernmetastasierung	22
4.1.3.1 Lymphknotenmetastasierung	22
4.1.3.2. Fernmetastasierung	23
4.1.4. L1-CAM Expression entsprechend der UICC-Klassifikation des Tumors	24
4.1.5. L1-CAM Expression entsprechend der Tumordifferenzierung	25
4.1.6. Tumorlokalisation und L1-CAM Expression	27
4.2. L1-CAM im Serum	28
4.2.1. L1-CAM Konzentration im Serum der Patienten	28
4.2.2 L1-CAM im Serum einer gesunden Vergleichsgruppe	29
4.2.3. L1-CAM Serumkonzentration bezogen auf Alter und Geschlecht sowie BMI	30
4.2.4. L1-CAM Serumkonzentration bezogen auf Lymphknoten- und Lebermetastasierung	30
4.2.4.1. L1-CAM Serumkonzentration und Lymphknotenmetastasierung	30
4.2.4.2. L1-CAM Serumkonzentration und Lebermetastasierung	31
4.2.5. L1-CAM im Serum bezogen auf die Tumorthherapie	33
4.3. L1-CAM histologisch und im Serum	33
5. Diskussion	35
6. Thesen	39
7. Zusammenfassung	40
8. Literaturverzeichnis	43
9. Anlagen	49

Bibliographische Beschreibung

Annekatriin Schulze

L1-CAM – ein Tumormarker für das Kolorektale Karzinom?

Universität Leipzig, Dissertation, 2016

50 S. (77 Lit., 22 Abb., 11 Tab., 2 S. Anlagen)

Referat:

Das Kolorektale Karzinom (KRK) ist eines der häufigsten malignen Erkrankungen, an in Deutschland jährlich 26000 Menschen versterben. Auf der Suche nach einem neuen Biomarker für dieses Malignom wurde in dieser Arbeit L1-CAM, ein neuronales Zell-Adhäsionsmolekül. Es ist, exprimiert an der Zelloberfläche, assoziiert mit einem signifikant schlechteren Outcome bedingt durch eine raschere lokale Tumorausbreitung und Metastasierung.

Es zeigte sich anhand der Untersuchung von 62 Tumorpräparate und 39 präoperativ gewonnenen Seren, dass L1-CAM sowohl immunhistologisch nachgewiesen auf der Tumoroberfläche als auch mittels ELISA bestimmt im Serum der Patienten nachweisbar ist. Patienten mit L1-CAM positiven Tumoren waren im Mittel deutlich jünger als Patienten ohne L1-CAM Expression (60 vs. 69 Jahre). Zudem zeigte sich, dass Patienten mit schwach L1-CAM positiven Tumoren im Mittel einen signifikant höheren BMI aufwiesen (Kruskal Wallis Test $p=0,0354$).

Die L1-CAM Expression hatte in unserem Patientengut keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorausbreitung, wenngleich wir eine häufigere Metastasierung in die Leber (44%) bei L1-CAM positiven Tumoren gegenüber Patienten ohne L1-CAM Expression im Tumor (29%) beobachteten. Gleiches gilt für die Infiltration der Perineuralscheiden durch Tumorzellen.

Bei der Untersuchung der L1-CAM Serumkonzentrationen zeigte sich im Mittel kein signifikanter Unterschied zu einer gesunden Vergleichsgruppe, sodass L1-CAM als Serum-Tumormarker ungeeignet zu sein scheint.

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC-GEN	Adenomatöses polyposis Coli Gen
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BMI	body mass index (Körpermasse-Index)
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-Protein 2
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	carcinoembryonic antigen (carcinoembryonales Antigen)
DGVS	Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DKG	Deutschen Krebsgesellschaft
EGFR	Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal regulated kinase (extrazellulär signalregulierte Kinase)
FGFR	fibroblast growth factor receptor (Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor)
GIST	gastrointestinal stromal tumor (Gastrointestinaler Stromatumor)
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
HER-2/EGFR	human epidermal growth factor receptor 2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2)/ epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
HNPPC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Hereditäres Nicht Polypöses Kolonkarzinom
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
IFB	Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum Adipositas Erkrankungen
JSCCR	Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum
KI	Konfidenzintervall
KRK	Kolorektales Karzinom
L1-CAM	L1-Zelladhäsionsmolekül
M2-PK	Pyruvatkinase M2

MAP	mitogen-activated protein (Mitogen-aktiviertes Protein)
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic -Kurve (Grenzwertoptimierungskurve)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
UICC	Union internationale contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
TCF	T-cell specific transcription factor (T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor)
TGF β 1	transforming growth factor β 1 (Transformierender Wachstumsfaktor β 1)
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
UICC	Union International contre le Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
Z.n.	Zustand nach
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einführung

Das Kolorektale Karzinom (KRK) ist laut Deutschem Krebsregister deutschlandweit eines der häufigsten malignen Erkrankungen und jährlich verantwortlich für ca. 26000 tumorassoziierte Sterbefälle. [1]

Es entsteht fast immer auf dem Boden von Adenomen der Darmschleimhaut-Drüsen, welche sich als Polypen im Darmtrakt darstellen. Risikofaktoren für deren Entstehung sind wiederum unter anderem Übergewicht, mangelnde Bewegung und Tabakkonsum. Weitere selten vorliegende Risikofaktoren sind das Vorhandensein einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, einer familiären adenomatösen Polyposis oder eines Lynch-Syndroms (HNPCC). [2]

Im Mittel erkranken die Patienten im Alter von 65 Jahren am KRK, weshalb ab dem 50. Lebensjahr eine regelmäßige Koloskopie empfohlen wird, um Vorstufen des Malignoms zu erkennen und zu beseitigen. Aufgrund der fehlenden Symptome im Anfangsstadium der Erkrankung wird sie dennoch häufig erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt. [1, 2]

Ist die Diagnose einmal gestellt, erfolgt die Behandlung entsprechend der AWMF S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ bestehend aus Chirurgie und ggf. (Radio-) Chemotherapie. Die Entscheidung über die Art und Dauer der Therapie beruht hierbei lediglich auf der makroskopisch und mikroskopisch nachweisbaren lokalen und systemischen Tumorausbreitung. [2] Es muss jedoch das Ziel sein, die Tumorthherapie individualisierter mit Hilfe biologischer Eigenschaften des jeweiligen Tumors anzupassen, um die derzeitige 5-Jahres-Überlebensrate von 65 Prozent weiter zu verbessern.

Für L1-CAM, ein Zell-Adhäsionsmolekül, welches physiologisch vorkommend eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielt, ist bereits bekannt, dass es an der invasiven Front auf der Oberfläche mancher kolorektaler Karzinome exprimiert wird und mit einer schlechten Prognose der Patienten mit verkürzter Überlebenszeit sowie gehäuft auftretenden Tumorrezidiven assoziiert ist. [3-5] In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Inzidenz der Expression und es ist zudem ungeklärt, wann und warum eine Expression des Moleküls stattfindet. [3, 4]

Da L1-CAM durch die Metalloprotease ADAM-10 auch von der Zelloberfläche abgespalten wird, ergibt sich weiterhin die Möglichkeit der Untersuchung auf seine Tauglichkeit als Serum-Tumormarker. [6, 7] Dies ist bisher lediglich für GIST und Ovarialkarzinom, nicht jedoch für das KRK überprüft worden. [8, 9]

In der vorliegenden Arbeit wird an einem Kollektiv von 60 Patienten mit Kolorektalem Karzinom die Expression von L1-CAM an der Zelloberfläche des Primärtumors sowie dessen quantitative Nachweisbarkeit in den Seren der Patienten untersucht.

Folgende wissenschaftliche Fragestellungen werden beantwortet:

1. Korreliert die Expression von L1-CAM im Kolorektalen Karzinom mit Parametern der Tumorausbreitung?
2. Ist die Expression von L1-CAM auf der Tumoroberfläche assoziiert mit anderen patientenspezifischen Charakteristika (Alter, Geschlecht, BMI)?
3. Kann L1-CAM im Serum von KRK-Patienten mittels ELISA nachgewiesen werden und wenn ja, korreliert die Konzentration mit der Expression im Primärtumor?
4. Ist die L1-CAM Serum-Konzentration von Patienten mit KRK im Vergleich mit altersentsprechenden Patienten ohne Malignom erhöht?

2. Grundlagen

Das Kolorektale Karzinom

Das Kolorektale Karzinom war laut Angaben des Deutschen Krebsregisters, geführt und ausgewertet vom Robert-Koch-Institut, zwischen 1990 und 2010 auf Platz zwei der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland und zudem auch die zweithäufigste Malignom-verursachte Todesursache. Vor der Jahrtausendwende wurde bei Männern und Frauen ein drastischer Anstieg um 40 beziehungsweise 25 Prozent verzeichnet, seither zeigen sich die Inzidenzraten jedoch konstant. Sie lagen 2004 für Männer bei 37000 und für Frauen bei 36000 jeweils pro 100000 Einwohner. Die Sterberaten hingegen nahmen seit den 80er Jahren bei Männern um 20 %, bei Frauen um 35 % ab. Jedoch verstarben im Jahr 2004 immer noch 28000 Menschen in Deutschland an den Folgen eines kolorektalen Karzinoms. Es besteht somit weiterhin Bedarf, die aktuellen Diagnostik- und Therapieregimes zu verbessern, um diese Zahlen weiter zu senken.

Seit 1999 erfolgt die Therapie des KRK in Deutschland nach der S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG). Aktualisierungen wurden 2004 und 2007 vorgenommen. [2]

Zur Prävention empfiehlt die Leitlinie regelmäßige körperliche Aktivität und Gewichtsreduktion, da dies zu einer geringeren Prävalenz von kolorektalen Adenomen führt, welche die Vorstufe des KRK bilden. Desweiteren werden zur Früherkennung der Malignome und seiner Vorstufen ab dem 50. Lebensjahr regelmäßige Tests auf okkultes Blut im Stuhl sowie Koloskopien angeboten.

Wird ein KRK diagnostiziert, erfolgt zunächst die radikale Resektion des Primärtumors mitsamt dessen Lymphabflußgebiets, wobei der einzuhaltende makroskopische Sicherheitsabstand abhängig von der Lokalisation des Primärtumors ist. Unter Berücksichtigung der Anatomie wird dies am Kolon als Hemikolektomie links oder rechts bzw. als erweiterte Hemikolektomie durchgeführt. Ist dies aufgrund der Tumorausdehnung nicht primär möglich, welches bei Rektumkarzinomen aufgrund der engen Nachbarschaft mit weiteren Organen häufig der Fall ist, erfolgt zunächst eine neoadjuvante Chemo- und / oder Strahlentherapie.

Wird eine Lymphknotenbeteiligung oder Fernmetastasen nachgewiesen, schließt sich der Operation eine adjuvante (Radio-)Chemotherapie an. Hierfür steht derzeit das FOLFOX-4-Protokoll zur Verfügung, welches aus einer Kombination der Zytostatika 5-Fluoruracil (5-FU) mit Folinsäure und Oxaliplatin besteht. Der Einsatz von Oxaliplatin konnte im Vergleich zur vorherigen alleinigen Anwendung von 5-FU / Folinsäure die

Rezidivrate senken, führt jedoch auch zu einer Polyneuropathie als schwerwiegende Nebenwirkung. [10]

Neben den allgemeinen Zystostatika kommen bereits auch monoklonale Antikörper in der Therapie zum Einsatz. Beispiele hierfür sind Bevacizumab, welcher den vascular endothelial growth factor (VEGF) blockiert und somit die Tumor-Angioneogenese beeinflusst, und Cetuximab sowie Panitumumab, welche jeweils an den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) binden und so das invasive Tumorstadium sowie die Metastasierung hemmen. Ihre Anwendung ist jedoch beschränkt auf Tumoren die keine Mutation im K-Ras-Gen aufweisen. Auch sie weisen wie die Zytostatika Nebenwirkungen auf und ihre Anwendung ist derzeit in der AWMF-Leitlinie noch nicht generell empfohlen.

Nicht nur in der Therapie des KKR, sondern auch in der Früherkennung und beim Monitoring des Therapieerfolgs macht man sich spezifische biologische Eigenschaften des Tumors zu Nutze. Die Pyruvatkinase M2 (M2-PK) beispielsweise ist ein Enzym aus dem Tumorstoffwechsel, welches im Stuhl zur Früherkennung eines KKR Verwendung findet, währenddessen das Carcinoembryonale Antigen (CEA) vom Tumor in das Blut abgegeben wird und somit in der Nachsorge zum Monitoring des Therapieerfolgs sowie zur Früherkennung von Tumorrezipiden seine Anwendung findet.

Physiologie des L1-Zell-Adhäsionsmoleküls

L1-CAM sind eine Gruppe neuronaler Zell-Adhäsions-Moleküle aus der Immunglobulin-Superfamilie. Sie bestehen extrazellulär aus sechs Immunglobulin-ähnlichen- und fünf Fibronektin Typ III Domänen, welche über eine einzelne transmembranäre Domäne mit dem zytoplasmatischen Anteil des Glykoproteins verbunden sind. Es wird in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems (insbesondere in postmitotischen Neuronen und nicht myelinisierenden Schwann-Zellen) exprimiert [11, 12] und spielt in deren Entwicklung eine wichtige Rolle. Es übernimmt Funktionen in der neuronalen Zellmigration, dem gerichteten Axon-Wachstum [13] und der Myelinisierung [14], der Synaptogenese, der Differenzierung neuronaler Zellen [15] während der Entwicklung des Nervensystems sowie der Sicherung des Zellüberlebens im Verlauf, einschließlich der Neuronen-Regeneration [16, 17].

Diese Funktionen werden sowohl über Zell-Zell-Adhäsion durch homophile Bindungen (z.B. während des Neuritenwachstums) [18] als auch über heterophile Bindungen zu anderen Molekülen aus der L1-CAM-Familie [19] sowie weiteren extrazellulären Matrixproteinen [20] und Integrinen [16] realisiert.

Zudem wurde L1-CAM physiologisch exprimiert, in Geweben nicht-neuronalen Ursprungs in Tieren nachgewiesen, beispielsweise in Maus-Leukozyten [21] und in

nicht proliferierenden Epithelien des Maus- und Bullen-Urogenitaltraktes, welche sich aus dem Wolffschen Gang entwickeln [22]. Im menschlichen Urogenitaltrakt wird es in den Zellen der Sammelrohre exprimiert. [23] Dessen Funktion in diesen Geweben ist jedoch noch nicht geklärt.

Pathologie von L1-CAM in physiologischen Geweben

Ein vollständiges Fehlen von L1-CAM führte in Experimenten mit knockout Mäusen zu deutlich reduzierter Groß- und Kleinhirnmasse [24-26], während Fehlfunktionen von L1-CAM, bedingt durch Mutationen in dessen Genloci auf dem X-Chromosom (Xq28) [27] Krankheitsbilder wie den x-linked Hydrocephalus, die x-chromosomal rezessiv vererbte spastische Paraplegie 1 sowie die Hypoplasie des Corpus callosum im Rahmen des MASA-Syndroms [28-30] bewirken.

Neben der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems wird mit Hilfe von L1-CAM auch die Entwicklung des enterischen Nervensystems über den Endothelin-Signalweg modifiziert und führt bei Mutationen des L1-Gens möglicherweise zu einer verstärkten Ausprägung des Morbus Hirschsprung [31].

Pathologie von L1-CAM in pathologischen Geweben

Seit der Entdeckung der Expression von L1-CAM auf der Zelloberfläche des malignen Melanoms 1986 [32] wurde das Molekül in einer Vielzahl weiterer maligner Tumoren nachgewiesen und in klinischen Studien untersucht. Wird es exprimiert, bewirkt es eine beschleunigte Tumorgenese (nachgewiesen im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom und Pankreaskarzinom) [33, 34], steigert die Motilität der Tumorzellen (gezeigt am Ovarialkarzinom und Mammakarzinom) [35, 36] und führt zu einer erhöhten Metastasierungspotenz der Tumoren mit frühzeitiger Metastasierung (z.B. Lungen-, Nieren- und Mammakarzinom, sowie Melanom) [32, 34, 37-40]. Die L1-CAM vermittelte Inhibition der Apoptose führt zudem zu einer Chemoresistenz der Tumorzellen und mindert somit den Erfolg der Chemotherapie (nachgewiesen im Pankreas- und Ovarialkarzinom) [41-43]. Folglich steht seine Expression in Zusammenhang mit einem signifikant schlechteren Outcome mit geringerer Überlebenszeit und erhöhten Tumor-Rezidivraten (z.B. malignes Melanom, Mamma- und Ovarialkarzinom, GIST) [8, 9, 38, 44].

Stoffwechselprozesse in Zusammenhang mit L1-CAM

Einige der Stoffwechselwege, welche L1-CAM diese umfangreichen Fähigkeiten im Zusammenhang mit der Tumorgenese und -progression verleihen, sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

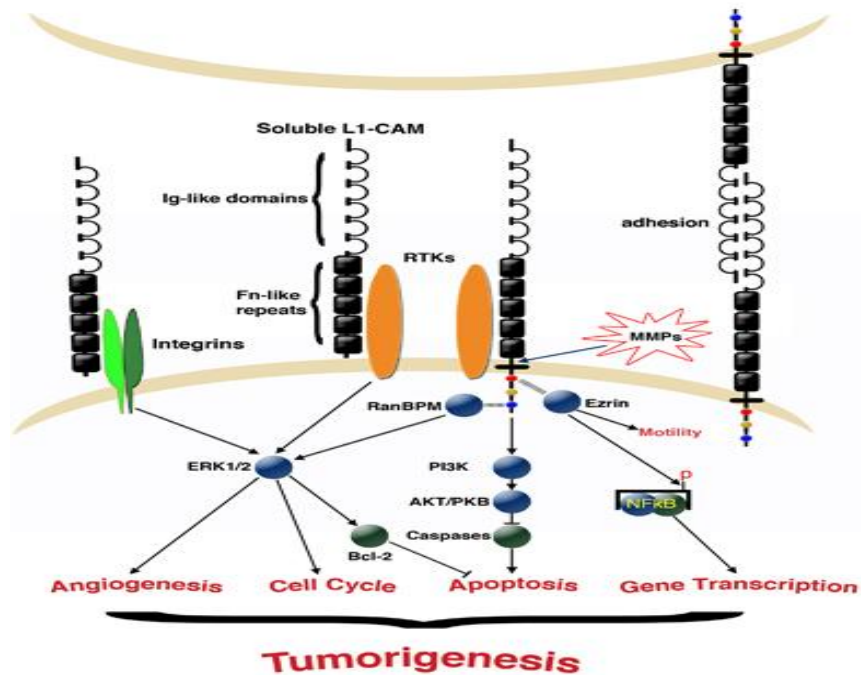


Abbildung 1: Stoffwechselwege von L1-CAM [45]

Die Expression von L1-CAM ist, wenn vorhanden, überwiegend an der invasiven Front des Tumors nachweisbar. [35, 46] Durch die Metalloprotease ADAM-10, welche koexprimiert wird, können die extrazellulären Domänen des Glykoproteins von der Zelloberfläche abgespalten werden und autokrin sowie parakrin wirken. Dies führt u.a. zu verstärkter Zellmigration [6, 7]. Die Bindung der Ig6-Domäne von gelösten L1-Molekülen an Integrine sowie an Rezeptor-Tyrosinkinasen bewirkt über die Aktivierung von extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERK) über die MAP-Kinase-Kaskade die Förderung der Angiogenese durch Hochregulation von VEGF-R2 [47] und führt zu gesteigertem Zellwachstum sowie vermehrter Zellproliferation. Eine Hochregulation dieses Signalweges durch Aktivierung oder Mutation der Komponenten ist in vielen Malignomentitäten nachweisbar. [48] Die Hemmung der Apoptose erfolgt zum einen über die Aktivierung von Bcl-2, ebenfalls durch aktivierte ERK [42], zum anderen durch die Hemmung von proapoptotischen Kaspasen [49], welche von membranständigem L1-CAM in Verbindung mit RTK vermittelt wird [50]. Ein weiterer Signalweg, welcher via Bindung von Ezrin an die intrazelluläre Domäne von L1-CAM aktiviert wird und im Kolorektalen Karzinom zur Ausbildung von Lebermetastasen führt, ist der NF-κB-Weg

[51, 52].

Einen Weg zur Induktion der Expression von L1-CAM als transmembranäres Adhäsionsmolekül bildet die Wnt-Signalkaskade, deren Überaktivierung bekanntermaßen in einer Vielzahl von Tumorentitäten zur Tumorgenese durch die ungehemmte Wirkung des Beta-Catenin- T-Zell-Faktor (TCF)- Komplexes beiträgt. [53] Zu einer Überaktivierung führt beispielsweise der gestörte Abbau des Beta-Catenins durch Mutationen der Gene, welche für den Proteinkomplex aus GSK-3 β , APC und Axin-1 selbst oder für deren Bindungsstelle an Beta-Catenin kodieren [46, 52]. Die Zielgene, welche durch den Beta-Catenin- TCF- Komplex intranukleär aktiviert werden, kodieren für verschiedene Proteine, welche u.a. eine wichtige Rolle in der Zellproliferation (Cyclin D1, c-MYC) [54-56] und Zelladhäsion (CD44, L1-CAM, ADAM-10 und andere Metalloproteasen) [46, 57] spielen. Ihre Überexpression trägt somit zur Tumorgenese bei. Ein weiterer bekannter Weg zur Induktion der L1-CAM-Expression ist die TGF β 1-vermittelte Expression, welche in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden konnte [41].

L1-CAM und das kolorektale Karzinom

In bis zu 90% der Patienten mit KRK lassen sich, auch in frühen Tumorstadien, Mutationen der Tumorzellen nachweisen, die zu einer Überaktivierung des zuvor beschriebenen Wnt-Signalwegs führen [58], wobei die β -Catenin Expression mit zunehmender Aggressivität des Tumors steigt. [59] Dessen Zielgene spielen sowohl zu Beginn der Tumorgenese durch Beeinflussung der Zellproliferation (c-MYC, Cyclin D1) als auch im Verlauf durch Ermöglichung von invasivem Wachstum und Ausbildung von Metastasen (CD44, L1-CAM, Metalloproteasen) eine Rolle. Zu welchem Zeitpunkt die Expression dieser Gene erfolgt und ob sie einem Muster folgt, bleibt unklar. In Bezug auf L1-CAM gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit der Expression im Kolorektalen Karzinom (10,9% bis 70% aller jeweils untersuchten Karzinome) [3, 4, 60] und auch dazu, ob es Stadien-abhängig exprimiert wird oder nicht. [3, 4] Im Falle einer Expression führt es jedoch zu frühzeitiger Ausbildung von Mikrometastasen und korreliert positiv mit einem schlechten Outcome für die Patienten [3, 4, 61].

3. Material und Methoden

3.1. Patientengut

Von 60 Patienten, welche zwischen Januar 2009 und April 2011 in der Chirurgischen Klinik II des Universitätsklinikums Leipzig an einem kolorektalen Karzinom operiert worden sind, wurden intraoperativ 62 Tumorpräparate und 39 gewonnen. Von allen Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung der Proben für Forschungszwecke vor.

Die Tumoren wurden zum einen in typischer Weise nach der TNM-Klassifikation der UICC eingestuft und zum anderen erfolgte die immunhistochemische Färbung der Präparate mit einem monoklonalen L1-CAM Antikörper. Die Serumproben wurden zunächst bei -80°C gelagert und im Verlauf zur Bestimmung der L1-CAM- und CEA-Konzentrationen mittels ELISA verwendet. Desweiteren wurden klinische und paraklinische Daten wie Alter, Größe, Gewicht, Nebenerkrankungen und verschiedene präoperative Laborparameter aus den Krankenakten der Patienten hinzugezogen. Für die Gewinnung der Serumproben liegt ein positives Ethikvotum im Rahmen unseres IFB AdipositasErkrankungen vor. Die immunhistochemische Färbung der Tumorpräparate erfolgte im Rahmen des Stagings.

Die Patienten, welche in die Studie eingeschlossen wurden, waren bei Operation des Malignoms im Mittel 67 Jahre alt, wobei Patienten mit Kolonkarzinom bei Diagnosestellung im Schnitt etwas jünger waren (65 Jahre) als solche mit Rektumkarzinomen (69 Jahre). Das Geschlechterverhältnis zeigte sich ausgeglichen. Bei Erstdiagnose waren mehr als die Hälfte der Tumoren bereits histopathologisch nachgewiesen in die Lymphknoten metastasiert, ca. 42% der Patienten zeigten zudem Fernmetastasen. Sechzehn (66,7%) der Rektumkarzinom-Patienten erhielten entsprechend den AWMF-Leitlinien für das kolorektale Karzinom eine neoadjuvante Therapie, während dies bei lediglich zwei (5,6%) der Kolonkarzinom-Patienten erforderlich war, um eine Resektabilität des Tumors zu erreichen. Eine adjuvante Therapie war hingegen jeweils bei über der Hälfte der Patienten mit Kolon- oder Rektumkarzinom indiziert. Dies ist in folgender Tabelle dargestellt.

	<u>Kolonkarzinom</u>	<u>Rektumkarzinom</u>	<u>Gesamt</u>
Alter	65.41+/-14.60	69.48+/-10.14	67.03+/-13.26
Geschlecht (weiblich:männlich)	18:18	12:12	30:30
UICC Tumorstadium	I 23,7%	I 16,7%	I 21,3%
	II 18,4%	II 20,8%	II 19,7%
	III 28,9%	III 41,7%	III 34,4%
	IV 28,9%	IV 16,7%	IV 24,6%
Lymphknotenmetastasen	47.22%	66.67%	52%
Fernmetastasen	44.4%	37.5%	41,67%
Neoadjuvante Therapie	5.56%	66.67%	30%
Adjuvante Therapie	52.78%	58.33%	55%

Tabelle 1: Alter und Geschlecht sowie Tumorstadium und Therapie unterschieden nach Tumorlokalisation

3.2. Immunhistochemische Färbung des Primärtumors von L1-CAM und Beurteilung der Expression

Die Bearbeitung der Proben erfolgte mit Hilfe von Frau Dr. Anne Kathrin Höhn, Oberärztin am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Leipzig.

Vorbereitung:

Die intraoperativ gewonnenen und in vierprozentigem Formalin aufbewahrten Primärtumorpräparate wurden in Paraffin (Thermo Scientific Histoplast Paraffin - IM; Melting point 56°C) eingebettet und drei Mikrometer dicke Schnitte mit dem manuellen Schlittenmikrotom (Thermo Scientific HM 430 Sliding Microtome) hergestellt.

Anschließend erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung in typischer Weise, um repräsentative Tumorregionen (peripher oder zentral mit vielen vitalen Tumorzellen und wenig Nekrose) zu identifizieren, auf deren Boden die Auswahl des Präparates mit einem möglichst vollständigen Schnitt durch alle Darmwandschichten, die der Tumor infiltriert, für die histopathologische Tumorbeurteilung auswählen zu können. Es erfolgte alsdann die Nachfärbung mit dem L1-CAM Antikörper.

Immunhistochemische Färbung mit L1-CAM Antikörper:

Initial wurde die gewebeeigene Peroxidase mit Peroxidaselösung (3% H₂O₂ in Methanol) über 15 min geblockt. Anschließend Vorbehandlung der Präparate im

Dampfgaser in einer Zitratpufferlösung mit einem pH-Wert von 9,0. Nun erfolgte die Inkubation mit dem gelösten primären Antikörper (monoclonal murine anti-human antibody IgG11, 1:100; clone UJ127, Thermo Scientific, , Fremont, CA, USA) für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Dieser bindet an die extrazelluläre Domäne des transmembranen L1-Proteins. Nachfolgend Zugabe des PostBlock Reagens und Einwirken dessen für 20 Minuten sowie anschließendes Sichtbarmachen der Immunreaktion mit dem HRP-Polymer (Zytomed Systems, ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit). Aufbringen des Chromogen (AEC) für 15 Minuten und Kontrolle der Farbintensität während der Entwicklung. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität Stoppen der Reaktion mit destilliertem Wasser und Gegenfärbung mit Mayers Hämalun-Lösung in typischer Weise. Wässriges Eindecken des Objektträgers.

Quantifizierung:

Die Quantifizierung der L1-CAM Expression erfolgte nach dem Vorbild der von Kaifi et al [3] durchgeführten Untersuchungen. In einem repräsentativen Keilschnitt durch alle Tumorschichten wurden 100 Zellen betrachtet und jeweils die Anzahl der positiv gefärbten Zellen bestimmt. Die Intensität, sowohl der Tumorzellen als auch zum Vergleich die der Ganglienzellen (Positivkontrolle), wurde auf einer Skala von 0 bis 3 bestimmt. Die L1-CAM Expression im Primärtumor wurde in drei Kategorien klassifiziert: negativ (keine Färbung), schwach positiv (Farbintensität der gefärbten Tumorzellen von 1 oder 2 sowie Färbung von 1-30% der Tumorzellen) und stark positiv (Farbintensität von 2 oder 3 sowie Färbung von über 30% der Tumorzellen). Als Positivkontrolle fungierten die Lymphknotenmetastase eines Neuroblastoms sowie die Ganglienzellen im Präparat.

In Abbildung 2 sind sowohl die HE-Übersichtsfärbungen in 25facher Vergrößerung (Spalte 1) als auch die L1-CAM immunhistochemischen Färbungen in 25facher (Spalte 2) sowie 100facher (Spalte 3) von drei Patienten beispielhaft dargestellt. Patient eins zeigt eine starke Expression von L1-CAM im Tumorgewebe, Patient zwei eine geringe Expression und Patient drei keine Expression von L1-CAM. Es zeigt sich zudem eine Färbung der Ganglienzellen in der L1-CAM Immunhistochemie, was zudem als interne Kontrolle dient.

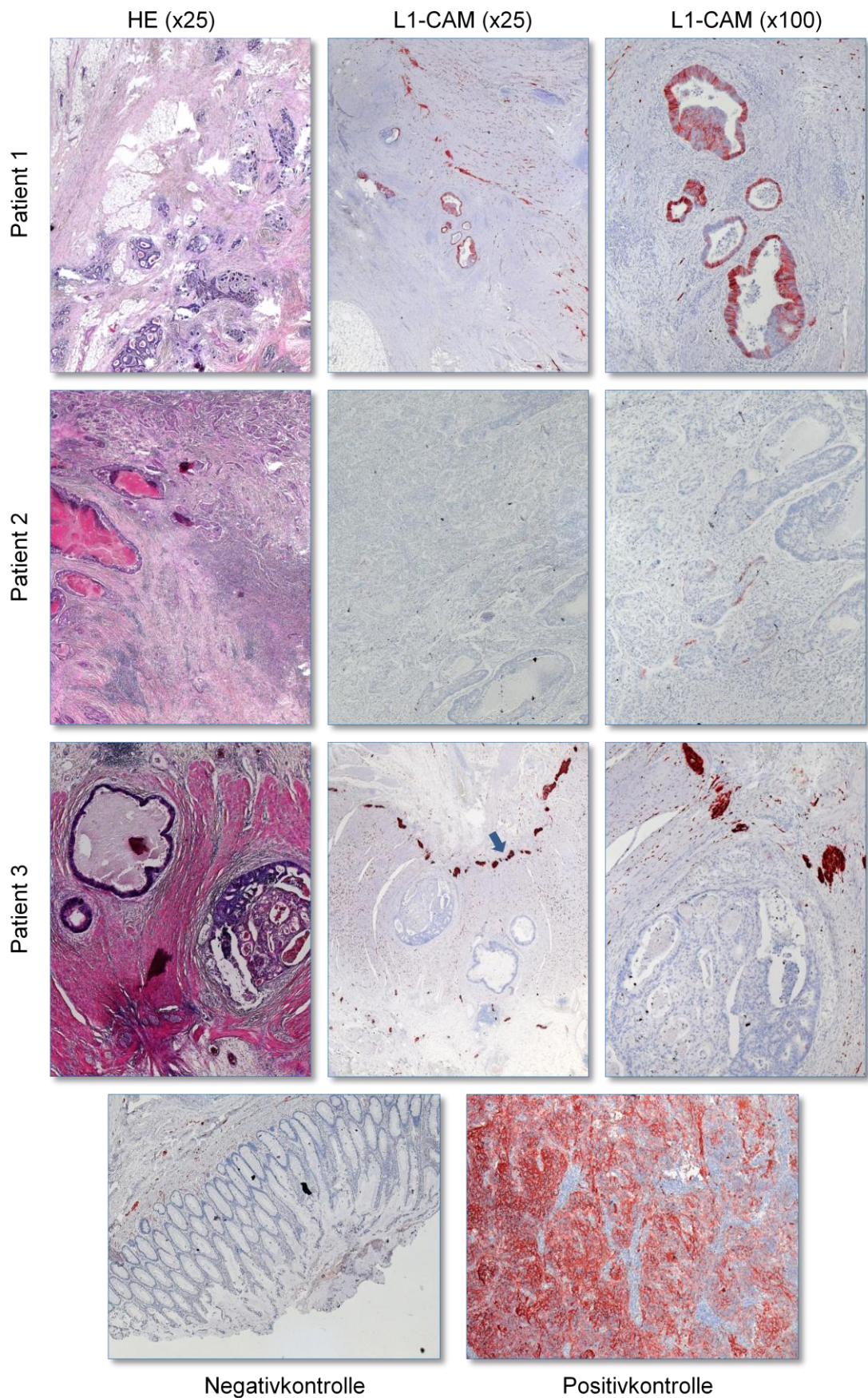


Abbildung 2: HE-Färbung und L1-CAM Immunhistochemie (1. Spalte HE Färbung 25x, 2. und 3. Spalte L1-CAM Immunhistologische Färbung durch Peroxidase mit dem monoklonalen Antikörper gegen UJ127 (25x, 100x). Negativkontrolle: normale Mucosa (50x). Positivkontrolle: Lymphknotenmetastase eines Neuroblastoms (100x).

3.3. Bestimmung der Serumkonzentrationen von L1-CAM und CEA

3.3.1. Bestimmung der Serum-Konzentration von L1-CAM mittels ELISA

Zur Bestimmung der Serum-Konzentration von L1-CAM wurde das ELISA-KIT von DRG (EIA-5074, monoklonale Maus-Antikörper gegen CD 171) verwendet:

Zunächst werden je 50µl der Reagenzien zur Ermittlung der Standardkurve, der Leerwert sowie die unverdünnten Serumproben in die Wells gegeben. Anschließend Aufbringen von Enzym-Konjugat auf die Wellplatten, Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend Auswaschen der Wells. Nun Zugabe des Enzymkomplexes in die Wells, erneute Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur und ebenfalls wie oben beschrieben Auswaschen und Spülen der Wells. Anschließend Auftragen der Substratlösung, Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und zuletzt Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Salzsäure. Die optische Dichte jedes Wells wurde nun bei 450 nm dem FLUOstar Optima (BMG Labtech) bestimmt und entsprechend der Standardkurve die L1-CAM Serumkonzentration bestimmt.

Es erfolgte eine Doppelbestimmung aller Werte einschließlich der Standardkurve. Die Mittelwerte kamen jeweils zur Auswertung. Der Mittelwert des Leerwertes wurde jeweils von den Mittelwerten der Serumkonzentrationen subtrahiert und anschließend mit der Standardkurve die Serumkonzentrationen von L1-CAM bestimmt.

3.3.2. Bestimmung der Serum-Konzentration von CEA mittels ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration von CEA im Serum der Patienten wurde das ELISA-KIT von ALPCO Diagnostics (25-CEAHU-E01, monoklonaler Antikörper gegen ein CEA-Antigen) verwendet. Aufbringen von je 50 µl des Standards und der Patientenseren auf eine 96er Wellplatte (Doppelbestimmung). Zugabe des Konjugat-Reagens und anschließende Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Entfernung der Inkubationslösung und Spülung der Wells. Nun wird das TMB Reagens in jedes Well gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anhalten der Reaktion mit Stopplösung und anschließendes Ablesen der optischen Dichte bei 450 nm mit dem FLUOstar Optima (BMG Labtech). Erstellen der Standardkurve und anhand dieser Bestimmung der CEA-Serumkonzentrationen in den Patientenseren aus den Mittelwerten der Doppelbestimmung. Der Mittelwert des Leerwertes wurde jeweils von den Mittelwerten der Serumkonzentrationen subtrahiert.

3.4. Statistik

Die Daten wurden im Microsoft Office 2010 Excel verwaltet und die Durchführung der statistischen Berechnungen sowie Erstellung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 5.01. Der Entwurf der Arbeit erfolgte mit Microsoft Word 2007 unter Verwaltung der Referenzen mit Endnote X7.

Die Analyse der immunhistochemischen Färbung mit L1-CAM entsprechend den Tumorstadien und Gradings erfolgte mit dem Fishers Exakten Test. Zur Darstellung der Ergebnisse der L1-CAM und CEA Serum-Konzentrationen wurden der Kruskal-Wallis-Test (Vergleich von Medianen, 3 oder mehr Gruppen)/ Mann-Whitney-U-Test (2 Gruppen) sowie ROC-Kurven verwendet. Alle Tests wurden zweiseitig mit einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. L1- CAM Immunhistochemie des Primärtumors

Von 60 Patienten wurden 62 Tumorpräparate intraoperativ gewonnen. Ein Patient zeigte bei Z.n. neoadjuvanter Therapie eine vollständige Regression des Tumors, zwei Patienten präsentierten zwei Tumoren simultan, jeweils rektal und sigmoidal bzw. rektosigmoidal.

In diesem Patientengut wiesen 41% der Tumoren eine L1-CAM Expression im Tumorgewebe auf, wobei 13% der Tumoren eine starke Expression zeigten.

4.1.1. L1-CAM Expression in Bezug auf Alter und Geschlecht sowie BMI

Vergleicht man Patienten mit Expression von L1-CAM an der Oberfläche des Primärtumors mit denen ohne diese ergibt sich, dass Patienten mit L1-negativen Tumoren im Median 69 Jahre alt waren, während Patienten mit Nachweis von L1-positiven Tumoren im Median 60 Jahre alt waren (Mann-Whitney-Test: $p=0.0657$).

Betrachtet man das Alter der Patienten in Abhängigkeit von der Stärke der Ausprägung der L1-CAM Expression, zeigt sich ebenfalls mit zunehmender Expression ein im Median jüngeres Patientengut, wobei der Zusammenhang untersucht mit dem Kruskal-Wallis Test ($p= 0.1629$) jedoch nicht signifikant ist.

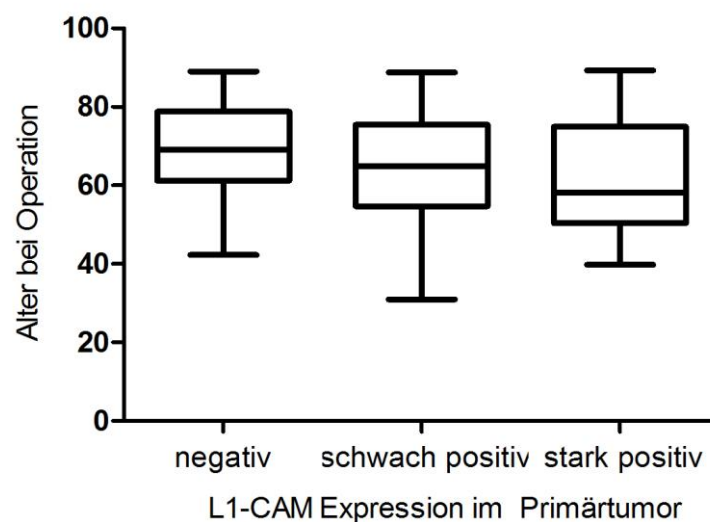


Abbildung 3: Boxplot Alter der Patienten bei Operation bezogen auf die L1-CAM Expression im Primärtumor.

L1-CAM-Status	negativ	schwach positiv	stark positiv
Anzahl Werte	36	17	8
Minimum	42,26	30,94	39,79
25. Perzentile	61,24	54,68	50,38
Median	69,08	64,88	58,18
75. Perzentile	78,83	75,45	74,99
Maximum	89,04	88,81	89,25

Tabelle 2: Alter der Patienten bei Operation nach L1-CAM Expression

In folgender Grafik ist die Verteilung der L1-CAM Expression bezogen auf das Geschlecht der Patienten aufgezeigt. Frauen waren bei Erstdiagnose im Schnitt 68,6 Jahre alt, Männer 66 Jahre. Es ergibt sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Expression von L1-CAM.

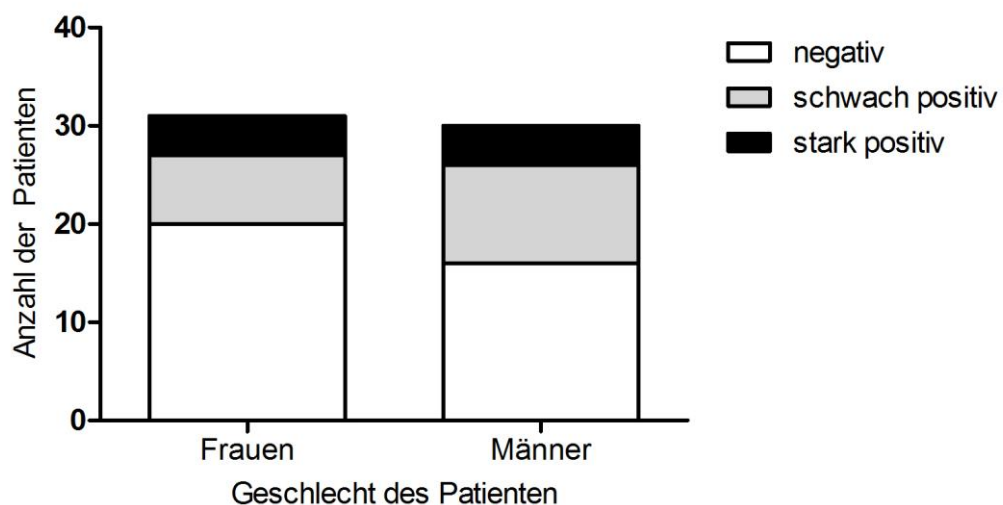


Abbildung 4: L1-CAM Expression unterschieden nach Geschlecht der Patienten

Untersucht man den BMI der Patienten in Abhängigkeit der L1-CAM Ausprägung, ergibt sich im Kruskal Wallis Test ($p=0,0354$) ein signifikanter Unterschied. In der Post HOC Analyse ergibt sich für den BMI der Patienten sowohl zwischen den Gruppen mit L1-negativen und L1-schwach positiven Tumoren (Mann-Whitney-Test $p=0,0381$) als auch zwischen Patienten mit L1-schwach positiven und L1-stark positiven Tumoren (Mann-Whitney-Test $p=0,0185$) ein signifikanter Unterschied, wobei sich die Patienten mit negativem und stark positivem L1-Status in ihrem BMI nicht signifikant unterscheiden (Mann-Whitney-Test $p=0,3455$).

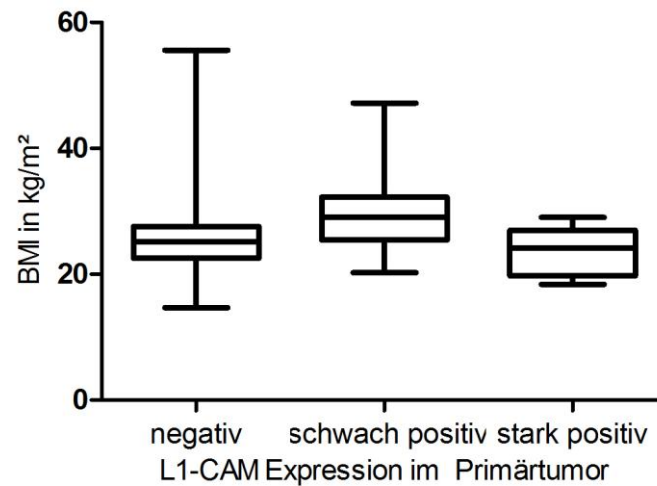


Abbildung 5: BMI der Patienten nach L1-CAM Expression

4.1.2. L1-CAM Expression entsprechend der Ausdehnung des Primärtumors

In folgender Tabelle ist die L1-CAM Expression bezogen auf die entsprechende Tiefenausdehnung des Primärtumors in der Wand des Kolorektums gemäß der TNM-Klassifikation der UICC (siehe Anhang) dargestellt.

L1-CAM	negativ		schwach positiv		stark positiv		gesamt
	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut
Tis	1	100% (2,8%)	0		0		1
T1	2	66,67% (5,6%)	1	33,33% (5,9%)	0		3
T2	6	60% (16,7%)	1	10% (5,9%)	3	30% (37,5%)	10
T3	21	58,3% (58,3%)	11	30,55% (64,7%)	4	11,11% (50%)	36
T4	6	54,54% (16,7%)	4	36,36% (23,5%)	1	9,09% (12,5%)	11
gesamt	36	59,02%	17	27,87%	8	13,11%	61

Tabelle 3: L1-CAM Expression entsprechend der Tumortiefenausdehnung

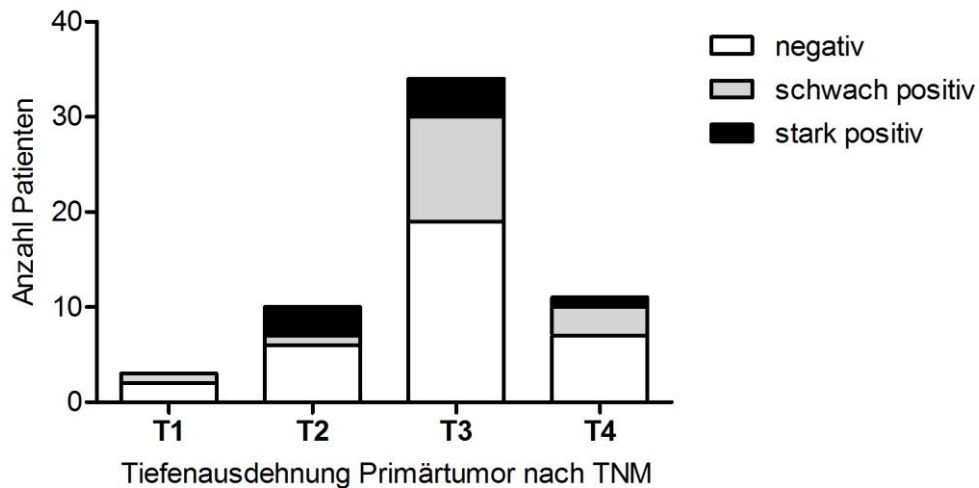


Abbildung 6: L1-CAM Expression entsprechend der Tumortiefenausdehnung

Eine Analyse mit dem Fisher's Exakten Test ($p=0.719$) ergab keine signifikant erhöhte Expression von L1-CAM in einem der T-Stadien. Insbesondere zeigt sich keine positive Korrelation der Tumortiefe mit der L1-CAM-Expression.

Neben der Tiefenausdehnung des Primärtumors im Gewebe wird auch die Infiltration von Lymphwegen, venösen Gefäßen und die Ausbildung von Perineuralscheiden histopathologisch beurteilt. Bis auf 3 Tumoren (2 davon L1-negativ, 1 L1- schwach positiv) haben alle Tumoren die Lymphwege infiltriert. Eine Infiltration venöser Gefäße zeigten 5 von 24 (20,8%) L1-positive Tumoren und 6 von 36 (16,7%) L1-negative Tumoren.

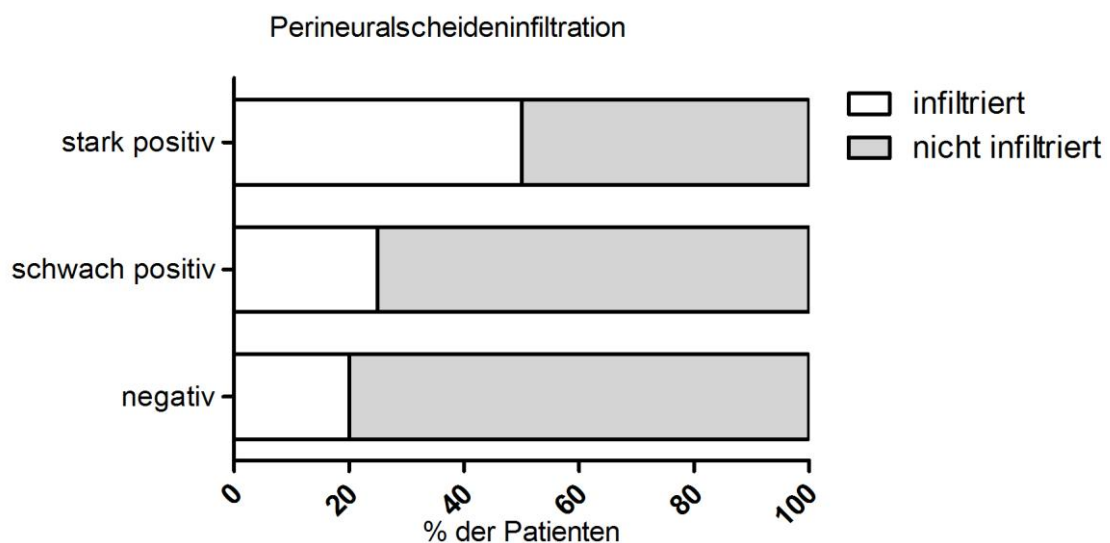


Abbildung 7: Perineuralscheideninfiltration in Abhängigkeit der L1-CAM Expression

In 15 der 61 (24,6%) Tumoren war eine Infiltration der Perineuralscheiden durch den

Tumor nachweisbar. Dabei weisen 4 von 15 Patienten (26,7%) mit Nachweis einer Perineuralscheideninfiltration gegenüber 4 von 44 Patienten (9,1%) mit Tumoren ohne Perineuralscheideninfiltration eine starke Expression von L1-CAM auf. Eine schwach ausgeprägte L1-CAM Expression ist in Tumoren mit und ohne Perineuralscheideninfiltration etwa gleich häufig (26,7 vs. 27,3%).

Umgekehrt zeigen Patienten mit starker Expression von L1-CAM zu 50% eine Infiltration der Perineuralscheiden, währenddessen Patienten mit einem Tumor geringer (25%) oder keiner (20%) weniger häufig die Perineuralscheiden infiltrieren, wie in Abbildung 7 dargestellt.

4.1.3. L1-CAM Expression und Lymphknoten- sowie Fernmetastasierung

4.1.3.1 Lymphknotenmetastasierung

In unserem Patientengut von 60 Patienten wurden bei 31 Patienten (ca. 52%) Lymphknotenmetastasen im Rahmen der postoperativen histopathologischen Aufarbeitung des Resektates nachgewiesen und entsprechend der TNM-Klassifikation (siehe Anhang) beurteilt und eingestuft. Eine Expression von L1-CAM im Primärtumor zeigte sich in allen Nodalstadien.

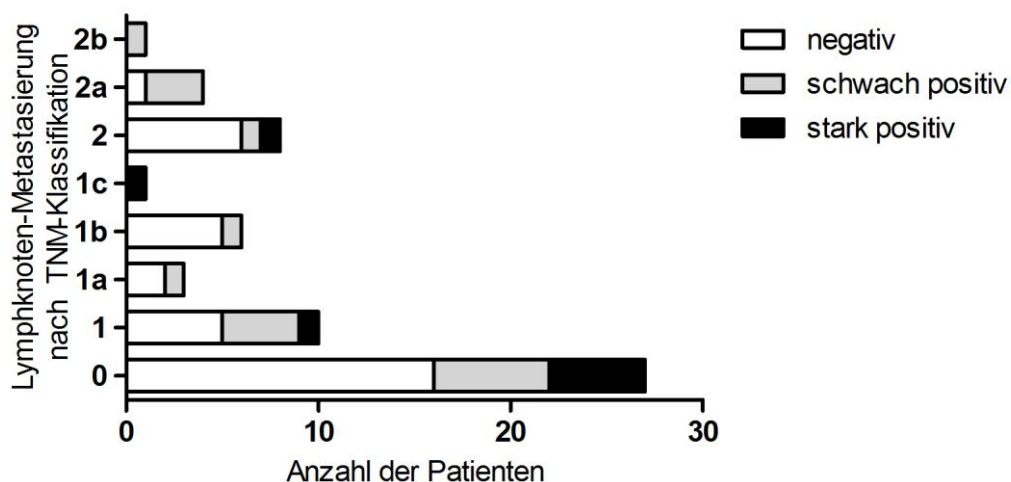


Abbildung 8: Lymphknotenmetastasierung nach TNM-Klassifikation und zugehörige L1-CAM Expression im Primärtumor

Bei der Untersuchung der Tumorpräparate unserer Patienten ohne histopathologisch nachweisbare Lymphknoteninfiltration waren die Primärtumoren in 40,7% der Fälle L1-CAM positiv, während bei Patienten mit Tumorinfiltration in die Lymphknoten 51,3% L1-CAM positiv waren.

Eine Analyse des Nodalstatus in Abhängigkeit von der L1-CAM Expression im

Primärtumor (Abbildung 7) mit dem Fisher's Exakten Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen ($p=0,401$).

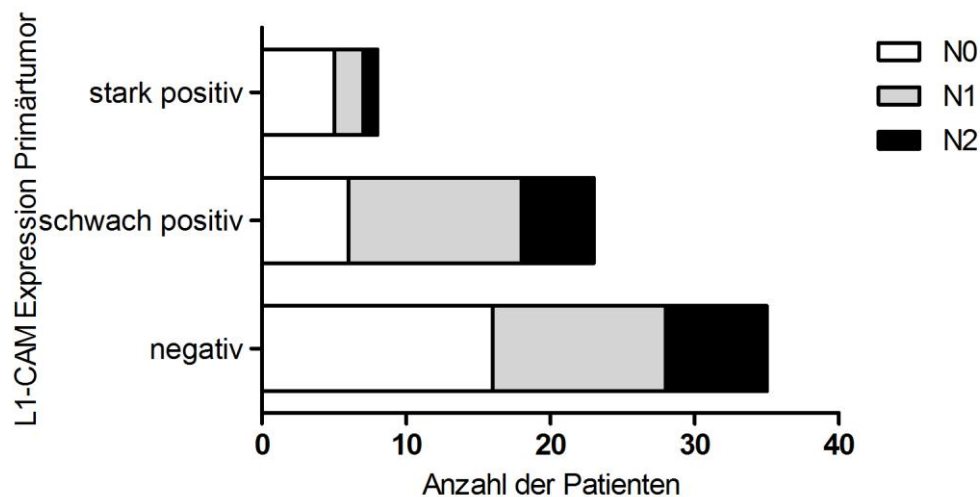


Abbildung 9: L1-CAM Expression bezogen auf den Lymphknotentumorbefall

4.1.3.2. Fernmetastasierung

In 42% der Patienten wurden makroskopisch Fernmetastasen im Rahmen der Staging-Diagnostik nachgewiesen. In 18,3% der Patienten zeigten sich ausschließlich Lebermetastasen, weitere 16,7% der Patienten präsentierten neben Lebermetastasen weitere Fernmetastasen. Die verbliebenen 7% der Patienten mit Fernmetastasen (in Lunge, Knochen und weiteren Organen) blieben ohne makroskopischen Nachweis von Lebermetastasen.

Abbildung acht und Tabelle vier zeigen die L1-CAM-Expression des Primärtumors bei Patienten ohne Lebermetastasen, mit Lebermetastasen und bei Patienten mit Nachweis von jeglichen Fernmetastasen. Patienten ohne Metastasen waren zu 36% L1-CAM positiv, während Patienten mit Lebermetastasen in 52% der Fälle eine Expression von L1-CAM boten. Von den vier Patienten, welche sich ohne makroskopisch nachweisbare Lebermetastasen, jedoch mit anderen Fernmetastasen vorstellten, waren drei L1-CAM negativ und einer stark L1-CAM positiv.

	M0	Lebermetastasen	Fernmetastasen
Negativ	23	10	8
Schwach positiv	9	8	4
Stark positiv	4	3	2

Tabelle 4: L1-CAM Expression und Fernmetastasierung

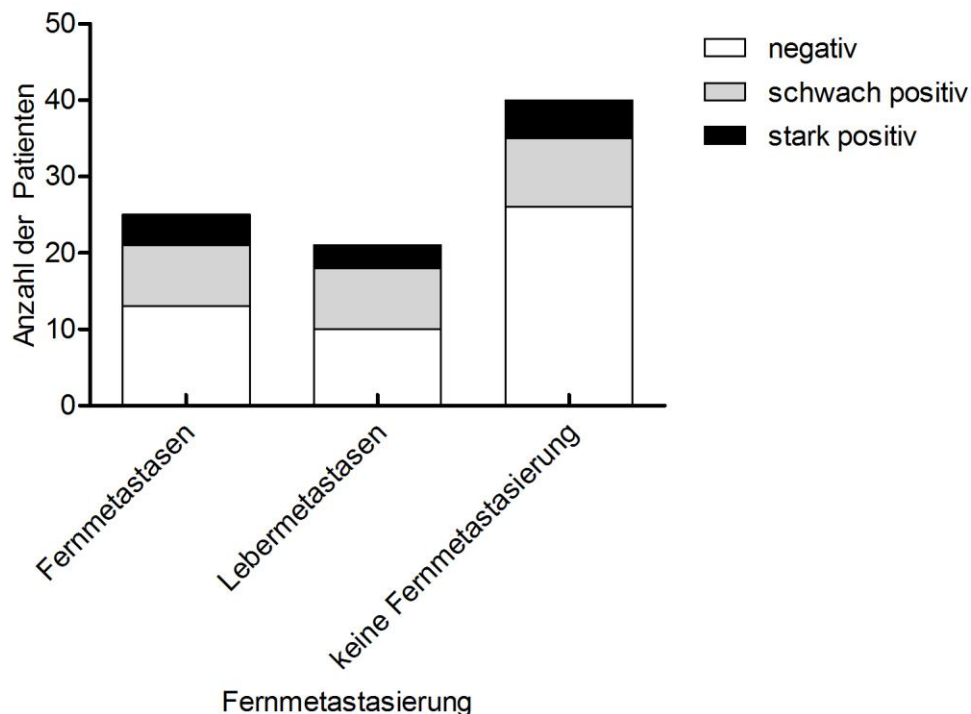


Abbildung 10: L1-CAM Expression und Fernmetastasierung

Patienten ohne L1-CAM Expression zeigten bei Diagnose in 29,4% Lebermetastasen, während L1-CAM positive Patienten bereits in 44% der Fälle mit Lebermetastasen diagnostiziert wurden. Diese Ergebnisse sind in der Analyse mit dem Fisher's Exakten Test nicht signifikant ($p=0,2736$).

4.1.4. L1-CAM Expression entsprechend der UICC-Klassifikation des Tumors

Zusammenfassend aus den vorangegangenen Ergebnissen der Tumorausdehnung ist in Tabelle fünf und Abbildung neun der immunhistologische Nachweis von L1-CAM im Primärtumor abhängig vom UICC-Stadium (siehe Anhang) dargestellt.

In allen Tumorstadien ist eine Expression von L1-CAM im Primärtumor nachweisbar. Wie bereits bei der Untersuchung der einzelnen Komponenten der TNM-Klassifikation festgestellt, kann auch bei der Auswertung der L1-CAM Expression in Abhängigkeit vom UICC Tumorstadium kein signifikant erhöhtes Expressionsmuster in einem der Stadien nachgewiesen werden (Fisher's Exakter Test: $p=0,643$).

	negativ		schwach positiv		stark positiv		gesamt
UICC	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut
1	8	61,54% (13,11%)	2	15,38% (3,28%)	3	23,08% (4,92%)	13
2	9	75% (14,75%)	2	16,67% (3,28%)	1	8,33% (1,64%)	12
3	12	57,14% (19,67%)	7	33,33% (11,48%)	2	9,52% (3,28%)	21
4	7	46,67% (11,48%)	6	40% (9,84%)	2	13,33% (3,28%)	13
gesamt	36	59,02%	17	27,87%	8	13,11%	61

Tabelle 5: L1-CAM-Expression nach UICC-Tumorstadium

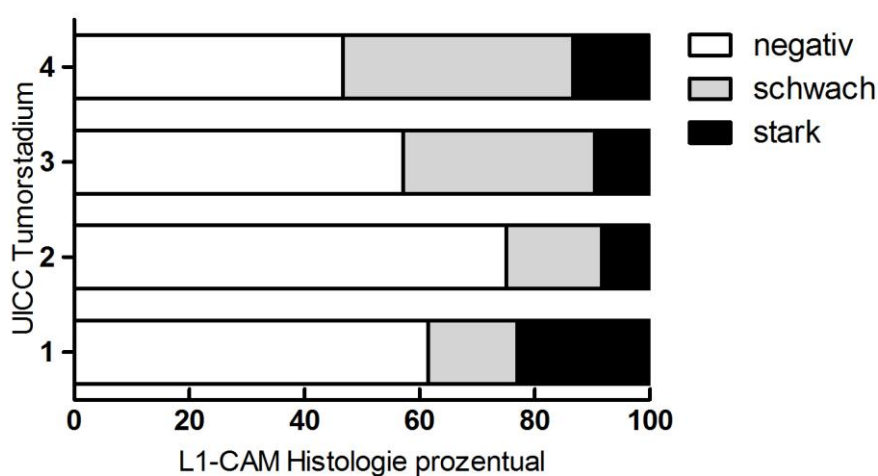


Abbildung 11: L1-CAM-Expression nach UICC-Tumorstadium

4.1.5. L1-CAM Expression entsprechend der Tumordifferenzierung

Die folgenden Graphen zeigen die Ausprägung der L1-CAM Expression bezogen auf den Differenzierungsgrad des Tumors entsprechend der WHO-Klassifikation (siehe Anhang). Diese Differenzierung kann nur in Tumoren, welche keine vorherige neoadjuvante Therapie erhalten haben, bestimmt und dargestellt werden. In unserem Patientengut waren dies 44 Tumoren von 42 Patienten. Eine Expression von L1-CAM konnte in allen vorliegenden Differenzierungsgraden (G1-G3) nachgewiesen werden, wobei sich eine starke Expression lediglich im Stadium G2 fand. Insgesamt waren 18 Patienten (40,9%) L1-CAM positiv, wobei 5 Patienten (11,4%) einen stark positiven

Nachweis von L1-CAM zeigten. Ein signifikant erhöhtes Auftreten von L1-CAM in einer der Differenzierungsgrade ist nicht zu belegen.

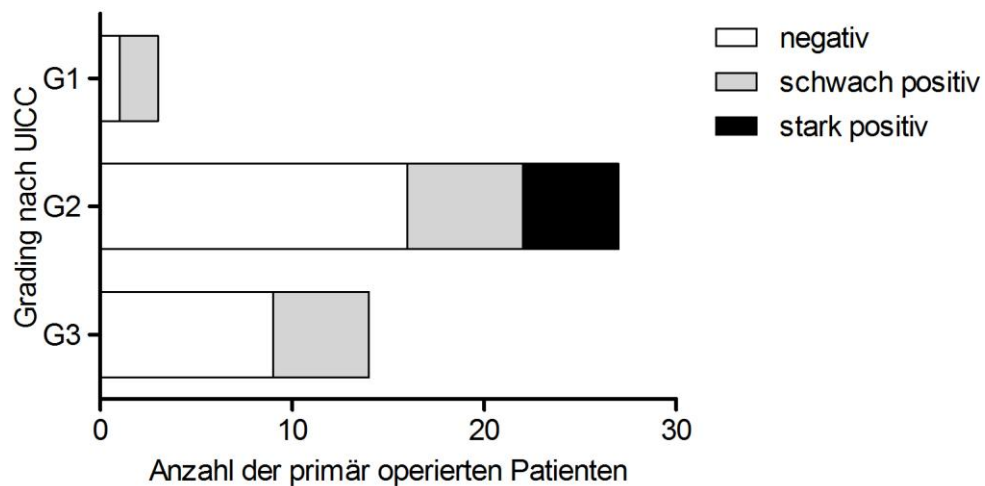


Abbildung 12: L1-CAM Expression nach WHO-Grading des Primärtumors

Die 18 Tumoren der Patienten, welche eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten, wurden nach der Klassifikation der Japanischen Gesellschaft für das kolorektale Karzinom (JSCCR) (siehe Anhang) hinsichtlich ihres Regressionsgrades beurteilt. Ein Patient zeigte eine vollständige Regression des Tumors (Grad 3 nach JSCCR). Somit war eine Untersuchung von Tumorgewebe entsprechend der TNM-Klassifikation und auf L1-CAM Expression nicht mehr möglich. Eine Expression von L1-CAM konnte in 7 von 18 (38,89%) Tumoren nachgewiesen werden, wobei 3 Malignome (16,7%) eine starke Expression aufwiesen.

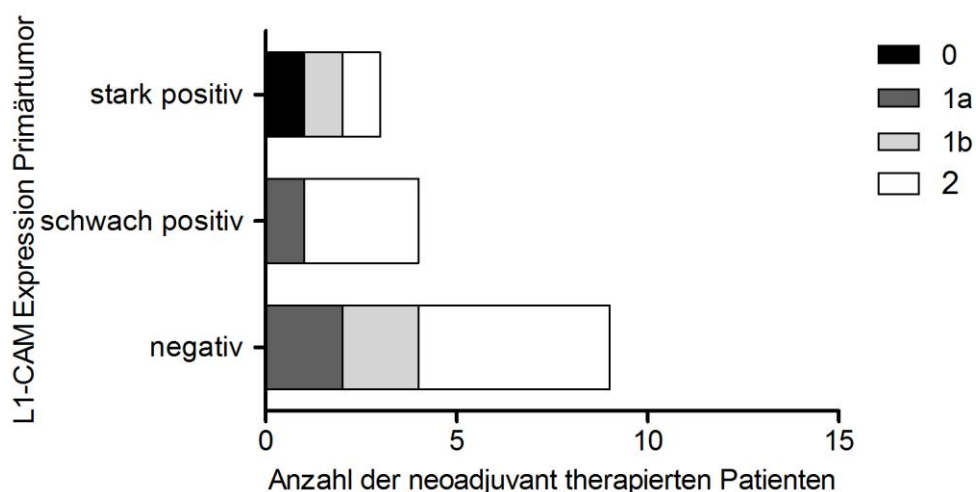


Abbildung 13: L1-CAM Expression nach Tumorregressionsgrad nach JSCCR bei neoadjuvant therapierten Patienten

In Abbildung elf sind die Regressionsgrade nach JSCCR in Abhängigkeit von der L1-CAM Expression des Primärtumors dargestellt. Keinerlei Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie (G0) konnte in nur einem Tumor nachgewiesen werden. Dieser zeigte ebenfalls eine starke Expression von L1-CAM. In der Gruppe der Patienten mit starker L1-CAM Expression befand sich jedoch auch ein Patient mit gutem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie (G2).

4.1.6. Tumorlokalisation und L1-CAM Expression

Rektumkarzinome sind im Vergleich zu Kolonkarzinomen bei Erstdiagnose charakterisiert durch eine größere Tumortiefe aufgrund der räumlichen Nähe zu den benachbarten Organen (32% T4 und 50% T3 vs. 11% T4 und 61% T3 beim Kolonkarzinom), zeigen jedoch eine vergleichbare Metastasierungsfrequenz in Lymphknoten (46% vs. 47%) sowie Häufigkeit an Fernmetastasen insgesamt (39% vs. 42%), wobei Metastasen in die Leber weniger auftraten (26,1% vs. 39,5%) und eine Metastasierung in die Lunge häufiger war (30% beim Rektumkarzinom vs. 8% beim Kolonkarzinom) aufgrund der unterschiedlichen Lymphabflußwege im distalen Rektum.

In Tabelle sieben und Abbildung zwölf ist die L1-CAM Expression im Primärtumor entsprechend der Tumorlokalisation im Kolon oder Rektum dargestellt.

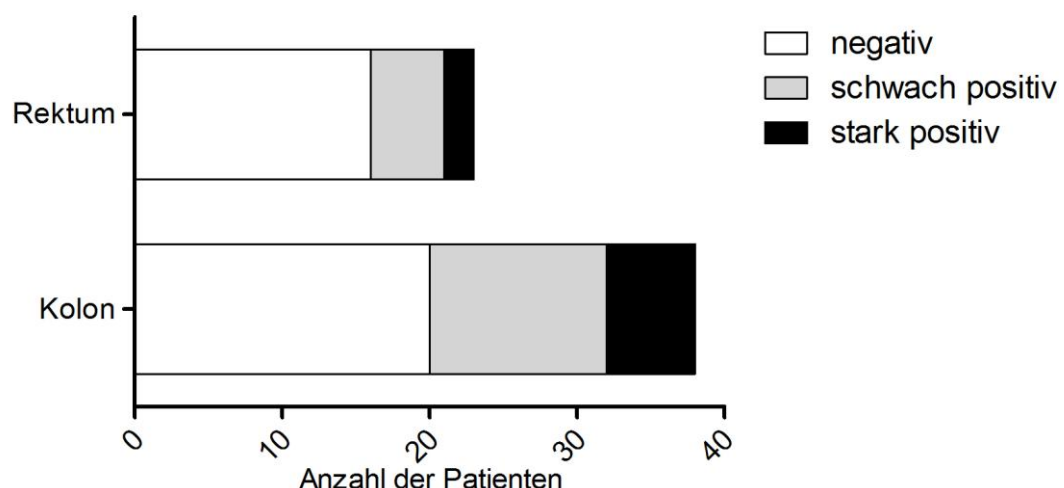


Abbildung 14: L1-CAM Expression im Kolon- und Rektumkarzinom

	negativ	schwach positiv	stark positiv
Kolon	20 (52,6%)	12 (31,6%)	6 (15,8%)
Rektum	16 (69,6%)	5 (21,7%)	2 (8,7%)

Tabelle 6: L1-CAM Expression im Kolon- und Rektumkarzinom

Die Kolonkarzinome zeigten tendenziell, jedoch nicht signifikant (Fishers Exakter Test 0,2831) eine häufigere Expression von L1-CAM im Primärtumor.

4.2. L1-CAM im Serum

4.2.1. L1-CAM Konzentration im Serum der Patienten

Mit Hilfe eines ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen L1-CAM (CD171) wurde die L1-CAM Serumkonzentration von 38 Patienten bestimmt. Der folgenden Grafik und Tabelle sind die Kenngrößen zu entnehmen. Die Serumkonzentrationen wiesen einen Median von 3,9 ng/ml auf. Sie zeigen keine Gaußsche Normalverteilung (D'Agostino und Person Test $p < 0,0001$). Ein Wert von 50,7 ng/ml wurde bei einem Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring bestimmt. Dieser wurde in Abbildung 15 zur besseren Veranschaulichung aller weiteren Werte außerhalb der Skalierung dargestellt.

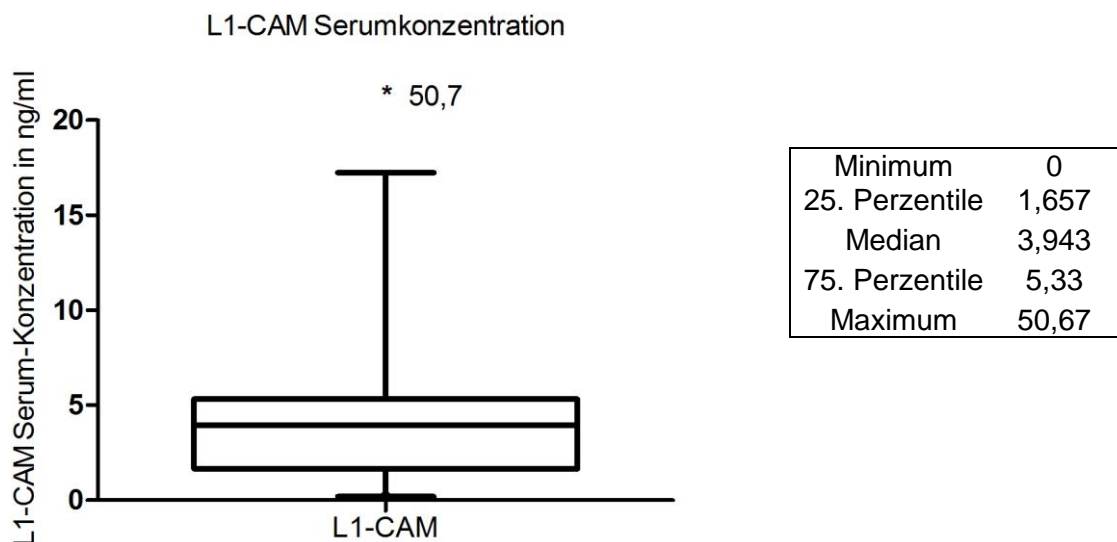


Abbildung 15 und Tabelle 7: L1-CAM Serumkonzentration

4.2.2 L1-CAM im Serum einer gesunden Vergleichsgruppe

Die Serumproben für die gesunde Vergleichsgruppe wurden zehn anamnestisch nicht krebskranken Patienten im Rahmen einer Routineuntersuchung vor einer geplanten orthopädischen Operation mit deren Einverständnis entnommen. Die gesunde Vergleichsgruppe hat ein mittleres Alter von 67 Jahren mit einer Standardabweichung von 12 Jahren. Dies entspricht annähernd der Alterszusammensetzung des Patientenkollektivs mit einem mittleren Alter von 65 Jahren und einer Standardabweichung von 14 Jahren.

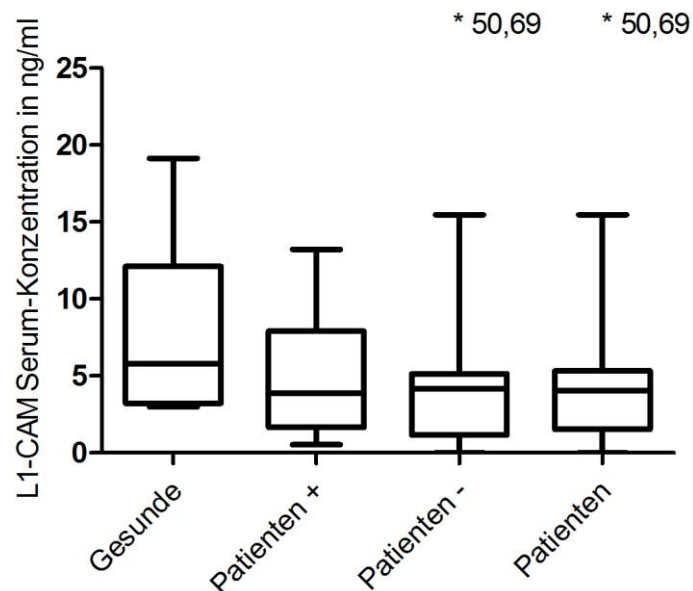


Abb. 16: L1-CAM Serumkonzentration einer gesunden Vergleichsgruppe

	Serum L1-CAM in ng/ml (Gesunde)	Serum L1-CAM in ng/ml (Patienten)	Serum L1-CAM in ng/ml (L1+ Tumoren)
Minimum	2,998	0,0	0,522
Median	5,789	4,186	3,892
Maximum	19,14	50,69	13,22
Mittelwert	7,826	5,959	5,255
Standardabweichung	5,597	8,843	4,508

Tabelle 8: L1-CAM Serumkonzentration der gesunden Vergleichsgruppe und der Patienten

Abbildung 16 zeigt die Boxplots der L1-Serum-Konzentrationen der gesunden Vergleichsgruppe und der Patienten. Die Patienten sind noch einmal aufgeschlüsselt in „Patienten +“ mit L1-CAM Nachweis im Primärtumor und „Patienten -“ ohne L1-CAM Expression im Tumor. In Tabelle 8 sind die Serum-Konzentrationen mit ihren Kennwerten im Vergleich dargestellt. Auch in den Seren der gesunden Patienten ist L1-

CAM nachweisbar. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte (Mann-Whitney-Test $p=0,15$) zwischen Patienten und Gesunden bzw. zwischen Gesunden und Patienten mit L1-CAM positiven Primärtumoren (Mann-Whitney-Test $p=0,21$).

4.2.3. L1-CAM Serumkonzentration bezogen auf Alter und Geschlecht sowie BMI

Es lässt sich keine lineare Korrelation der L1-CAM Serumkonzentration mit dem Alter nachweisen (Korrelationskoeffizient nach Pearson $-0,1$, $p=0,55$). Auch im Vergleich der über- und unterdurchschnittlich alten Patienten ergibt sich kein Unterschied, wie Abbildung 18 zeigt.

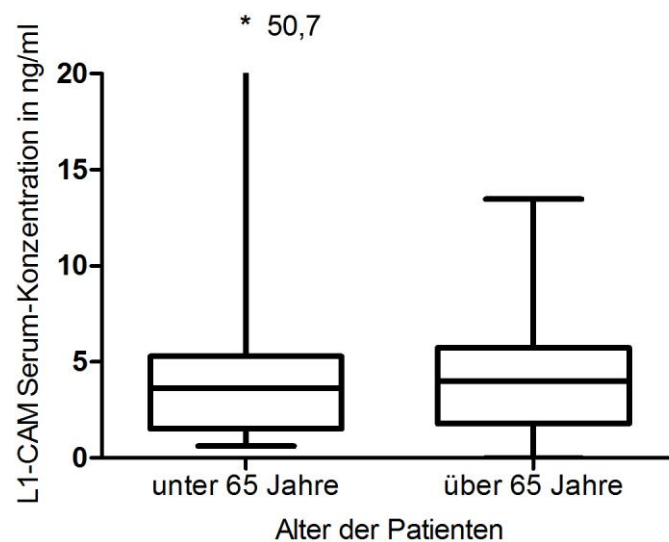


Abbildung 17: Serumkonzentration L1-CAM unter und über dem Alter von 65 Jahren

Bezogen auf das Geschlecht der Patienten (Mann-Whitney Test $p=0,245$) sowie im Vergleich von Patienten mit über- und unterdurchschnittlichem BMI (Mann-Whitney-Test $p=0,715$) zeigt sich jeweils kein signifikanter Unterschied in der Serumkonzentrationen von L1-CAM der Patienten.

4.2.4. L1-CAM Serumkonzentration bezogen auf Lymphknoten- und Lebermetastasierung

4.2.4.1. L1-CAM Serumkonzentration und Lymphknotenmetastasierung

In Abbildung 16 ist die L1-CAM Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus nach der TNM-Klassifikation dargestellt. Mit dem Kruskal-Wallis-Test lässt sich ein signifikanter Unterschied der Serumkonzentrationen in den einzelnen Nodalstadien nachweisen ($p=0,044$). In der Post-HOC-Analyse mit dem Mann-Whitney-Test ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Mediane für die

Serumkonzentrationen von N1 und N2 ($p=0,037$). Im Vergleich zwischen N0 und N1 (Mann-Whitney-Test $p=0,132$) sowie zwischen N0 und N2 (Mann-Whitney-Test $p=0,083$) ist der Unterschied nicht signifikant.

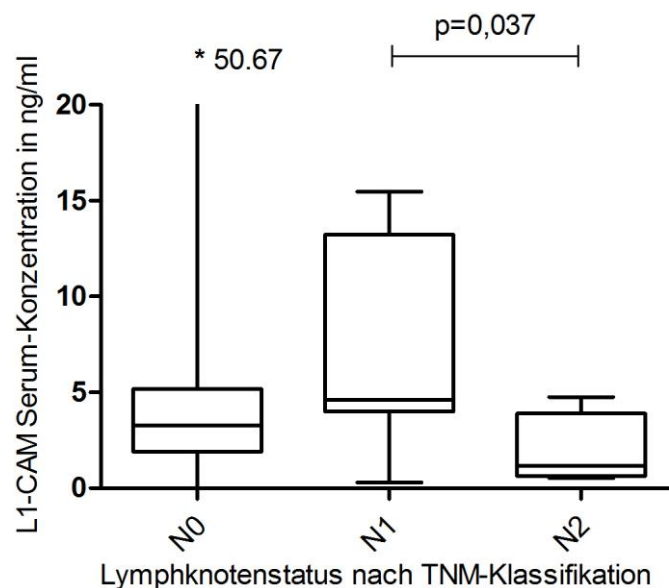


Abbildung 18: Serumkonzentration L1-CAM entsprechend des Lymphknotenbefalls nach TNM-Klassifikation

4.2.4.2. L1-CAM Serumkonzentration und Lebermetastasierung

Tabelle 9 zeigt die statistischen Kenngrößen der L1-CAM Serumkonzentrationsverteilung bei Patienten mit und ohne makroskopisch nachweisbare Lebermetastasen (Mann-Whitney-Test 0,64).

	Lebermetastasen	ohne Lebermetastasen
Anzahl der Werte	14	24
Minimum	0,5220	0,0
25% Perzentile	1,120	1,770
Median	3,627	3,356
75% Perzentile	12,83	4,873
Maximum	15,48	50,67
Mittelwert	5,795	5,554
Standardabweichung	5,467	10,02

Tabelle 9: Serumkonzentration L1-CAM bei Patienten mit und ohne Lebermetastasen

Die Abbildung 17 und 18 zeigen Receiver operating characteristic (ROC)-Kurven, zum einen von den mittels ELISA ermittelten CEA-Serumkonzentrationen ($p=0,007$) und zum anderen von L1-CAM-Serumkonzentrationen ($p=0,471$), in Abhängigkeit des Vorhandenseins von Lebermetastasen.

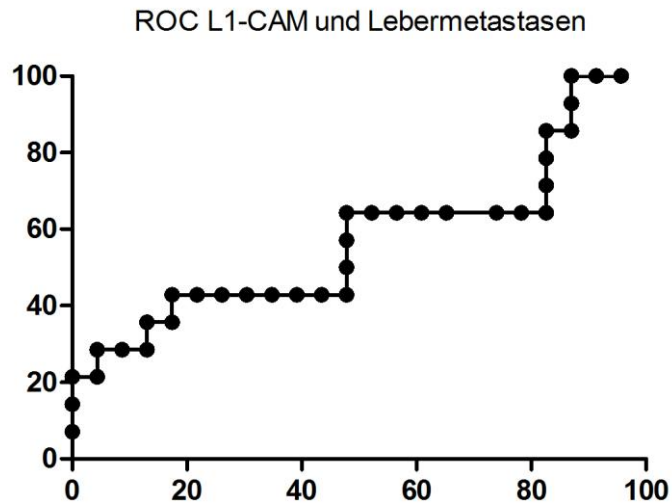


Abbildung 19: ROC-Kurve der Serumkonzentrationen von L1-CAM mit und ohne Lebermetastasierung

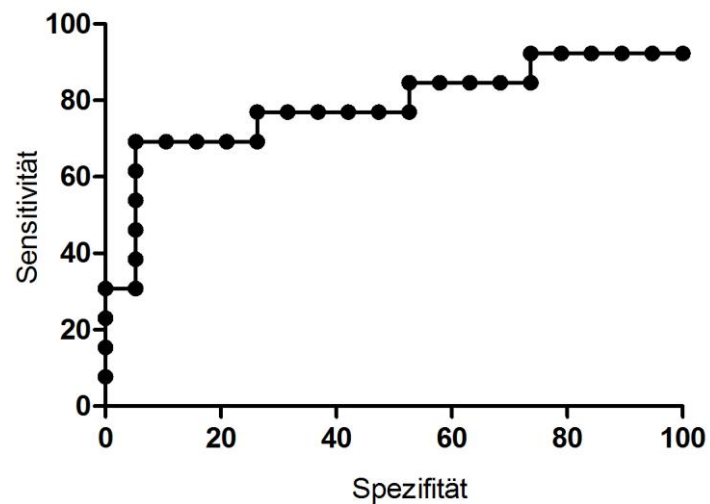


Abbildung 20: ROC-Kurve der Serumkonzentration von CEA mit und ohne Lebermetastasierung

Zur Unterscheidung von Patienten mit und ohne Lebermetastasen anhand der CEA-Serumkonzentration errechnet sich auch der ROC-Kurve eine Sensitivität von 69% (95% Konfidenzintervall (KI): 39%-91%) und eine Spezifität von 95% (95% KI: 74%-100%).

4.2.5. L1-CAM im Serum bezogen auf die Tumorthherapie

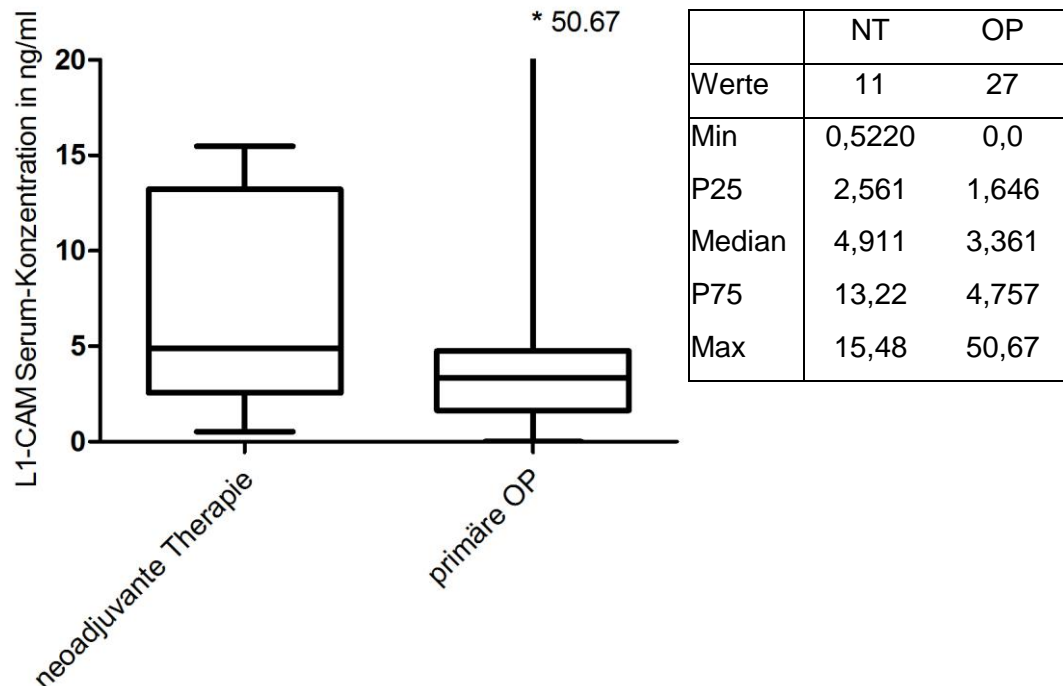


Abbildung 21 und Tabelle 10: L1-CAM Serumkonzentration im Vergleich mit und ohne neoadjuvante Therapie (NT= neoadjuvante Therapie, OP= primäre OP)

Abbildung 21 und Tabelle 10 zeigen die L1-CAM Serumkonzentrationen von Patienten mit und ohne neoadjuvante Therapie. Es zeigt sich ein Trend zu einer höheren Serumkonzentration bei Patienten, welche vorbehandelt sind (Mann-Whitney-Test $p=0,1475$).

4.3. L1-CAM histologisch und im Serum

Folgend sind die Konzentrationen von L1-CAM im Serum in Abhängigkeit von der Expression von L1-CAM im Primärtumor dargestellt. Eine Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,728$), aus den erhobenen Werten lässt sich jedoch ein Trend zu höheren L1-CAM Serumkonzentrationen erkennen, je ausgeprägter die Expression im Primärtumor ist. Jedoch ist L1-CAM auch in Seren von Patienten nachzuweisen, welche kein L1-CAM im Primärtumor exprimieren.

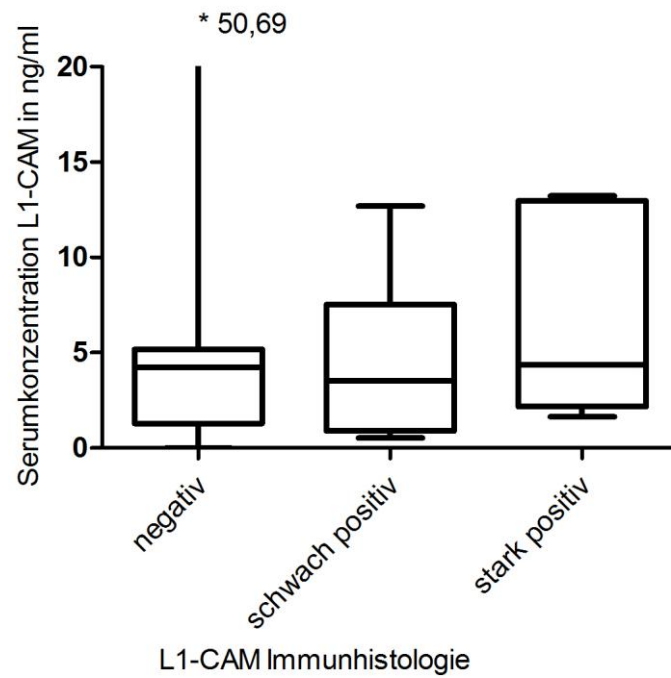


Abbildung 22: L1-CAM Serumkonzentration und L1-CAM Immunhistologie

	L1-CAM in ng/ml L1 negativer Tumor	L1-CAM in ng/ml L1 schwach positiver Tumor	L1-CAM in ng/ml L1 stark positiver Tumor
Anzahl Patienten	20	10	5
Minimum	0,0	0,52	1,65
P25	1,29	0,89	2,18
Median	4,22	3,54	4,38
P75	5,17	7,53	12,97
Maximum	50,67	12,70	13,22

Tabelle 11: L1-CAM Serumkonzentration und L1-CAM Immunhistologie

5. Diskussion

Auf der Suche nach einem neuen Serum-Tumormarker und zudem möglichen Angriffspunkt für eine gezielte Tumorthherapie untersuchten wir die Expression von L1-CAM in Zellen des kolorektalen Karzinoms sowie dessen Serum-Konzentration präoperativ. Es ist bereits bekannt, dass die Expression von L1-CAM mit Mikrometastasierung in Lymphknoten und Knochenmark sowie mit der Metastasierung in die Leber assoziiert ist und so für ein signifikant schlechteres Outcome der Patienten mitverantwortlich ist [3]. In 25 unserer 61 Proben kolorektaler Karzinome (41%) konnte eine Expression von L1-CAM nachgewiesen werden, wobei 8 von 61 Tumoren (13,1%) eine starke Expression zeigten. Kaifi et al. [3] beschrieben eine L1-CAM Expression in 13% der Primärtumoren von 375 Patienten mit kolorektalen Karzinomen, unterschieden in der Auswertung jedoch nicht zwischen schwach und stark positiv exprimierenden Tumoren. Andere Studien fanden in 70% bzw. 10,5% L1-CAM positive kolorektale Karzinome [53-55].

In Bezug auf das Alter der Patienten bei Operation zeigt sich, dass Patienten mit einer starken L1-CAM Expression im Median jünger sind (58 Jahre) als Patienten mit schwacher Expression (65 Jahre) und keiner Expression des Moleküls (69 Jahre). Dies ist jedoch in unserem Patientengut nicht signifikant (Mann-Whitney-Test L1-positiver vs. L1-negativer Tumorpatienten $p=0.0657$). Auch die Daten von Kaifi et al. [3] zeigen dieses Ergebnis (16% L1-positive Tumoren der unter 60 Jährigen vs. 11% bei über 60 Jährigen). Eine Studie von Endreseth et al. fand bei Rektumkarzinom-Patienten unter 40 Jahren bei Erstdiagnose ein fortgeschrittenes Tumorstadium, häufigeres Auftreten von Fernmetastasen, auch nach Therapie, sowie ein geringeres Gesamtüberleben dieser Patientengruppe im Vergleich zu bei Erstdiagnose älteren Patienten. [62] Eine weitere Studie von O'Connell et al. ergab, dass Patienten dieser Altersgruppe ebenso in einem weiter fortgeschrittenen Tumorstadium erstdiagnostiziert wurden und zudem schlechter differenzierte Tumoren aufwiesen, das Fünfjahres-Überleben zeigte sich jedoch für die Tumorstadien zwei und vier signifikant besser im Vergleich zu älteren Patienten. [63] Eine Ursache hierfür könnte das aggressivere Therapieregime sein, welches bei jüngeren Patienten gehäuft angewandt wird. Dies geht auch aus einer Studie von Quah et al. hervor. [64] Eine Untersuchung an Mamma-Karzinom-Patienten zeigte für die Patientengruppe unter 45 Jahren eine deutlich höhere Malignität der Tumoren im Vergleich zu Patienten über 65 Jahren aufgrund der Modifikation einer Reihe von prognostisch ungünstigen genetischen Faktoren in den Tumorzellen, welche u.a. zu einer geringeren Hormonsensitivität sowie einer häufigeren HER-2/EGFR Expression führen. [65] Für das kolorektale Karzinom sind ebenfalls multiple

genetische und epigenetische Alterationen bekannt, welche zur Malignität beitragen sowie hereditäre Mutationen wie bei der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) oder dem hereditären nicht adenomatösen Kolonkarzinom (HNPCC), welche frühzeitig zur Ausbildung von Kolonkarzinomen führen. [66] Ob es jedoch altersabhängig zur Ausprägung verschiedener molekularer Muster in den Tumoren kommt und dies der Grund für das aggressivere Verhalten der Tumoren mit jüngerem Patientenalter sein könnte, ist bisher nicht untersucht.

Ein bekannter Risikofaktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms ist die Adipositas [67], [68], jedoch auch für diesen Zusammenhang sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher unbekannt. Es wurde gezeigt, dass regelmäßige Bewegung das Risiko minimieren kann, Polypen und Adenome, die Vorstufen des KRK, auszubilden [69]. Ob die regelmäßige körperliche Betätigung oder die daraus resultierende Gewichtsabnahme hierfür ursächlich ist, bleibt unklar. In unserem Patientengut zeigen Patienten mit schwacher Expression von L1-CAM beispielsweise einen signifikant höheren BMI als Patienten mit starker und Patienten ohne L1-CAM Expression (Kruskal-Wallis-Test $p=0.017$). Dies könnte ein weiteres Beispiel dafür sein, dass in den Zellen von Menschen mit Adipositas veränderte Genexpressionsmuster vorliegen, die die Ausbildung von Malignomen begünstigen. Es sind bereits Untersuchungen zur Klärung dieser Zusammenhänge im Gange, jedoch steht man noch am Anfang der Investigation (z.B. [70, 71]).

In der Auswertung der L1-CAM Expression in Zusammenhang mit der lokalen Ausbreitung sowie mit dem Differenzierungsgrad des Primärtumors zeigt sich, dass die Expression des Moleküls sowohl unabhängig vom T-Stadium nach UICC als auch unabhängig vom Differenzierungsgrad (nach WHO) exprimiert wird. In allen T-Stadien ist die Expression von L1-CAM ungefähr gleich häufig. Auch im Stadium T1 lässt sich L1-CAM bereits im Primärtumor nachweisen. Ebenso zeigen Tumoren aller nachgewiesenen Differenzierungsgrade (G1-G3) eine L1-CAM Expression, wobei in unserem Patientengut lediglich in G2 eine starke Expression des Adhäsionsmoleküls nachweisbar ist. Da in den bisherigen Therapie-Regimes jedoch lediglich die Klassifikation des Tumors nach der UICC und der WHO zur Therapie-Entscheidung zugrunde gelegt wird, ist bei bekannt schlechterem Outcome in Zusammenhang mit der L1-CAM Expression im Tumor, in Erwägung zu ziehen, das Molekül standardmäßig zu untersuchen und daraufhin gegebenenfalls die Therapie anzupassen.

Denn auch diese Studie belegt eine deutlich höhere Rate an Lebermetastasen von 44% in Patienten mit L1-CAM Expression gegenüber 29,4% in Patienten ohne deren Expression, auch wenn dies nicht signifikant ist. Dass in Kolonkarzinomzellen exprimiertes L1-CAM Lebermetastasen induzieren kann, wurde von Gavert et al.

bereits in Mäusen gezeigt [61]. Dort wurden diese Zellen in die Milzen der Tiere injiziert und formten anschließend Metastasen in der Leber. Zudem ist bekannt, dass L1-CAM die Disseminierung einzelner Tumorzellen in die lokoregionären Lymphknoten und das Knochenmark fördert [3], eine verstärkte Ausbildung von histopathologisch nachweisbaren Makrometastasen in den Lymphknoten aufgrund der L1-CAM Expression im Primärtumor kann an unserem Patientengut jedoch nicht belegt werden. Neben der L1-Positivität des Primärtumors des kolorektalen Karzinoms ist auch seine Perineuralscheideninfiltration ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein schlechtes Outcome der Patienten. [3, 72, 73] In unserem Patientengut zeigten Tumoren, welche die Perineuralscheiden nachweislich infiltriert hatten, häufiger eine starke Expression von L1-CAM in den Tumorzellen (26,7%) als Tumoren ohne Perineuralscheideninfiltration (9,1%). Ob ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten L1-CAM Expression der Tumorzellen und der Infiltration der obligat L1-CAM exprimierenden Zellen des Plexus submucosus und Plexus myentericus besteht, wäre ein interessanter Aspekt zur Untersuchung in zukünftigen Studien.

Im Vergleich zwischen neoadjuvant therapierten und primär operierten Patienten ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von L1-CAM. Bemerkenswert ist jedoch, dass die beiden einzigen Kolonkarzinompatienten in der Gruppe der neoadjuvant Therapierten eine starke L1-CAM-Expression zeigten. Diese beiden Patienten waren 54 und 56 Jahre alt und zeigten beide bei Erstdiagnose bereits Lymphknoten- und Lebermetastasen. Betrachtet man das Ansprechen auf die Chemotherapie ergibt sich, dass der einzige Patient in unserem Patientengut, welcher keinerlei Ansprechen auf die Chemotherapie zeigte, in der Gruppe der stark L1-positiven Tumoren zu finden ist. Für einen Nachweis der Chemotherapie-Resistenz des KRK in Zusammenhang mit der Expression von L1-CAM ist unsere Fallzahl zu gering. Für das Pankreaskarzinom wird L1-CAM bereits eine Rolle bei der Chemotherapie-Resistenz zugeschrieben, für das kolorektale Karzinom ist dies bisher nicht eindeutig untersucht, jedoch ist nachgewiesen, dass das Molekül zu einer Apoptoseresistenz führt und dem Tumor so eine gewisse Chemotherapie-Resistenz verleiht. [41]

L1-CAM ist jedoch nicht nur im Primärtumor nachweisbar, sondern wird sowohl von der Oberfläche der Zellen durch die Metalloprotease ADAM-10 abgespalten als auch in Exosomen zusammen mit ADAM-10 abgegeben. Für GIST-Tumoren und Ovarial- sowie Endometriumkarzinome ist bereits belegt, dass die Serum L-CAM-Konzentrationen [8, 9] im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht sind. Nicht untersucht wurde jedoch der Zusammenhang zwischen L1-CAM Serumkonzentration und der Expression auf dem Primärtumor. In unserem Patientengut konnten von 38 Patienten präoperativ Serumproben gewonnen werden,

welche mittels ELISA auf deren L1-CAM Konzentration untersucht wurden. Das Molekül konnte in nahezu allen Serumproben nachgewiesen werden. In Korrelation mit der Expression von L1-CAM im Primärtumor zeigt sich ein Trend zu höheren L1-CAM Serumwerten, je ausgeprägter die L1-CAM Expression im Primärtumor ist, eine signifikante Korrelation besteht jedoch nicht. Verglichen mit einer altersentsprechenden Vergleichsgruppe gesunder Patienten zeigt sich im Rahmen unseres Patientenguts, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der L1-Serum-Konzentration der Patienten und der Gesunden besteht. Auch wenn man die gesunde Vergleichsgruppe ausschließlich mit der Gruppe von Patienten mit L1-CAM positiven Primärtumoren vergleicht, ergibt sich kein Unterschied in der L1-CAM-Serumkonzentration. Somit müssen weitere Studien klären, ob die Serum-L1-CAM Konzentration überhaupt Rückschlüsse auf die L1-CAM Expression im Primärtumor zulässt.

Dementsprechend zeigt sich die Serum-Konzentration von L1-CAM im Vergleich mit CEA, dem bisher sensitivsten Tumormarker bezogen auf Lebermetastasierung und Tumorrezidiverkennung, deutlich unterlegen in der Prädiktion von Lebermetastasen, ersichtlich an der Auswertung der ROC-Kurven der Serum-ELISA-Werte im Vergleich. CEA wird zum Monitoring des Therapieerfolges verwendet und ist in 65% der Fälle das erste Anzeichen für einen erneuten Progress der Erkrankung. Es kann zudem unter Umständen die Operabilität von Tumorrezidiven einschätzen helfen. Dennoch liegt kein Überlebensvorteil in der Bestimmung dieses Tumormarkers. Zur Erkennung von frühen Tumorstadien sowie von Lymphknotenmetastasen spielt es keine Rolle. [74, 75]

In der Auswertung der Serum-Konzentrationen von L1-CAM in Bezug auf den Nodalstatus zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit den Nodalstadien N0, N1 und N2. Die Post-HOC Analyse ergibt einen signifikanten Unterschied der Levels von Patienten in den Stadien 1 und 2. Ob ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen den Nodalstadien 0 und 1 besteht und L1-CAM somit als Serummarker für die Lymphknotenmetastasierung verwendet werden kann, muss in einer Studie mit größerer Fallzahl überprüft werden.

Im Vergleich der L1-CAM Serumkonzentration von Patienten, die zunächst eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten, mit Patienten, welche primär operiert worden sind, zeigen sich im Mittel etwas höhere Werte für Patienten mit neoadjuvanter Therapie (Mann-Whitney-Test $p=0,14$), dies ist allerdings nicht signifikant.

In Zusammenschau der Ergebnisse ist für das kolorektale Karzinom L1-CAM als Serum-Tumormarker in jeder Hinsicht ungeeignet. Die Bestimmung des Moleküls auf der Oberfläche des Primärtumors erscheint hingegen sinnvoll, da seine Expression mit einem schlechteren Outcome für die Patienten assoziiert ist und somit ggf. eine Anpassung der Therapie erforderlich macht.

6. Thesen

1. Patienten mit einer L1-CAM Expression im Primärtumor zeigen einen Trend zu jüngerem Erkrankungsalter bzw. jüngere Karzinompatienten zeigen häufiger eine L1-CAM Expression des Primärtumors.
2. Der BMI von Patienten mit schwach L1-CAM positiven Karzinomen ist im Median jeweils signifikant höher als der von Patienten mit stark L1-CAM positiven Karzinomen und von Patienten ohne L1-CAM Expression.
3. Tumore, welche L1-CAM stark exprimieren, infiltrieren häufiger die Perineuralscheiden.
4. Obwohl der Zusammenhang von L1-CAM Expression im Primärtumor und der verstärkten Mikrometastasierung in Lymphknoten bekannt ist, ist in unserem Patientengut keine Korrelation zwischen der Expression von L1-CAM und dem mikroskopisch nachweisbaren Makrometastasen der Lymphknoten eingeordnet nach TNM-Klassifikation nachzuweisen.
5. In allen Differenzierungsgraden des kolorektalen Karzinoms nach UICC ist eine L1-CAM-Expression nachweisbar. In unserem Patientengut sind jedoch ausschließlich Tumore mit dem Differenzierungsgrad G2 stark L1-CAM positiv.
6. L1-CAM ist in nahezu allen Serien der Patienten mit kolorektalem Karzinom nachweisbar, auch in solchen, in denen keine Expression von L1-CAM im Primärtumor nachzuweisen ist.
7. Die L1-CAM Serumkonzentration zeigt einen Trend zu höheren Werten, je ausgeprägter die L1-CAM Expression im Primärtumor ist.
8. Die L1-CAM Serumkonzentration, bestimmt mit dem ELISA (monoklonale Antikörper gegen CD171) zeigt keine Abhängigkeit von Alter, Geschlecht oder BMI.
9. Im Vergleich der Serum L1-CAM Konzentrationen der Patienten und einer nicht tumorerkrankten altersentsprechenden Vergleichsgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied.
10. Zwischen den L1-CAM Serumkonzentrationen von Patienten mit und ohne makroskopisch nachweisbare Lebermetastasen besteht in unserem Patientengut kein signifikanter Unterschied. Die L1-CAM-Serumkonzentration ist somit zur Erkennung von Lebermetastasen nicht geeignet und im Vergleich mit der CEA-Serumkonzentration, welche hierfür bisher verwendet wird, deutlich unterlegen.
11. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den L1-CAM Serumkonzentrationen der Nodalstadien N1 und N2, wobei die Konzentration bei Patienten mit Nodalstatus 1 signifikant höher ist als bei Patienten mit Nodalstatus 2.

7. Zusammenfassung

Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist ein Malignom mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 65 Jahren, welches auf dem Boden von Adenomen der Darmschleimhaut entsteht und an welchem trotz standardisierter Therapie in Deutschland jährlich immer noch ca. 26000 Menschen versterben.

Auf der Suche nach einem Biomarker, welcher geeignet zur Früherkennung, Verlaufsbeurteilung des Therapie-Erfolgs und zur Abschätzung der Prognose sein kann, untersuchten wir L1-CAM, ein neuronales Zell-Adhäsionsmolekül. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion während der Entwicklung des zentralen Nervensystems und wurde desweiteren auch an der Zelloberfläche mehrerer maligner Tumoren, unter anderem im kolorektalen Karzinom, nachgewiesen. Es ist dort assoziiert mit einem signifikant schlechteren Outcome bedingt durch eine raschere lokale Tumorausbreitung und Metastasierung. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit der Expression des Moleküls im kolorektalen Karzinom und es bleibt ungeklärt, unter welchen Umständen sie auftritt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Expression von L1-CAM im Hinblick auf die Charakteristika des Malignoms (Ausbreitungs- und Differenzierungsgrad, Metastasierung, Regressionspotential unter Therapie) sowie in Zusammenhang mit weiteren patientenspezifischen Faktoren (Alter, BMI, Geschlecht) hin zu untersuchen, und die mögliche Verwendbarkeit von L1-CAM als Serum-Tumormarker zu evaluieren.

Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden 62 Tumorpräparate von 60 Patienten, welche zwischen Januar 2009 und April 2011 in der Klinik für Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Leipzig an einem kolorektalen Karzinom operiert worden sind, mittels Immunhistochemie auf ihre Expression von L1-CAM hin untersucht. Desweiteren wurden präoperativ von 39 dieser Patienten Serumproben gewonnen und die Konzentrationen von L1-CAM und CEA mittels ELISA bestimmt.

Als gesunde altersentsprechende Vergleichsgruppe für die L1-CAM Serum-Konzentration ohne das Vorliegen einer malignen Erkrankung fungierten die Seren von 10 Patienten der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Dresden.

Ergebnisse

In 41% der Primärtumoren konnten wir die Expression von L1-CAM nachweisen, wobei 13% der Tumoren eine starke Expression zeigten. Patienten mit L1-CAM positiven Tumoren waren im Schnitt deutlich jünger (mittleres Erkrankungsalter 60 Jahre),

während Patienten ohne L1-CAM Expression im Mittel 69 Jahre alt waren. Das Geschlecht der Patienten hatte hingegen keinen Einfluss auf die Expression des Moleküls.

Vergleicht man den BMI der Patienten in Abhängigkeit von der Stärke der Expression von L1-CAM, ist dieser im Mittel signifikant höher bei Patienten mit schwacher L1-CAM-Expression (Kruskal Wallis Test $p=0,0354$). Auf die L1-CAM Konzentration im Serum hat er in unserem Patientengut jedoch keinen Einfluss.

Betrachtet man die Tumorausbreitung im Hinblick auf die Expression von L1-CAM im Primärtumor, zeigt sich, dass L1-CAM positive Tumoren in allen T-Stadien nach TNM-Klassifikation vorhanden sind. Es konnte in Primärtumoren ab einer Ausbreitungstiefe bis in die Muskularis (T2) nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist, dass sich alle Tumoren mit einer starken L1-CAM Expression im Differenzierungsgrad G2 nach WHO befanden.

Der Nachweis von L1-CAM hatte in unserem Patientengut keinen signifikanten Einfluss auf die Rate der Metastasierung in lokoregionäre Lymphknoten oder die Ausbildung von nachweisbaren Fernmetastasen. Dennoch ist eine häufigere Metastasierung in die Leber bei Patienten mit L1-CAM positiven Tumoren (44%) gegenüber Patienten ohne L1-CAM Expression (29%) nachzuweisen.

Diese Ergebnisse decken sich mit dem Befund, dass in Patienten mit L1-CAM positiven Tumoren auch keine verstärkte Infiltration der Lymphwege oder des Venensystems nachzuweisen sind. Es zeigt sich hingegen jedoch bei stark L1-CAM positiven Tumoren in 50% der Fälle eine Infiltration der Perineuralscheiden gegenüber Patienten ohne oder nur geringer L1-CAM-Expression (20% Perineuralscheiden-Infiltration), welches mit seiner ursprünglichen Aufgabe als Zell-Adhäsions- und Zell-Zell-Kommunikationsmolekül im Bereich des Nervensystems erklärt werden kann.

Ein Vergleich der mittleren Serum L1-CAM Konzentrationen zeigte einen Trend zu höheren Konzentrationen, je stärker die Expression des Moleküls im Primärtumor war, dies war jedoch nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test $p=0,73$). Im Vergleich der Konzentrationen im Serum mit altersentsprechenden Gesunden ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied, sodass L1-CAM, bestimmt mit dem ELISA, nicht als Tumormarker im kolorektalen Karzinom anwendbar zu sein scheint. Auch zur Vorhersage des Vorliegens von Lebermetastasen ist die L1-CAM Serumkonzentration im Vergleich mit der aktuell zur Verlaufskontrolle verwendeten CEA-Konzentration im Serum deutlich unterlegen.

Ausblick

Auch wenn L1-CAM, bestimmt mittels ELISA, keine Verwendung als Serum-Tumormarker finden kann, ist es dennoch lohnenswert, seine Expression im Primärtumor des kolorektalen Karzinoms zu bestimmen, denn bei seiner Expression liegen häufiger Lebermetastasen vor mit folglich schlechterem Outcome der Patienten. Dies kann zur Anpassung der adjuvanten Therapie hilfreich sein.

Weitere Studien müssen klären, inwieweit die veränderte Stoffwechsellage von Patienten mit Adipositas tatsächlich häufiger zur Expression von L1-CAM und anderer prognostisch ungünstiger Oberflächenmoleküle in den Tumoren dieser Patienten führt bzw. sogar eine Tumorentstehung begünstigt und ob die Kommunikation der Tumorzellen via L1-CAM mit den Nerven des enterischen Nervensystems für die Metastasierung in die Leber verantwortlich ist.

8. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. Unter: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html. (Version vom 24.02.2016, Autor: Günther Dettweiler)
2. Pox, C., et al., [S3-guideline colorectal cancer version 1.0]. (1439-7803 (Electronic)).
3. Kaifi, J.T., et al., *L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer*. Mod Pathol, 2007. **20**(11): p. 1183-90.
4. Boo, Y.J., et al., *L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(5): p. 1703-11.
5. Kajiwara, Y., et al., *Expression of I1 cell adhesion molecule and morphologic features at the invasive front of colorectal cancer*. Am J Clin Pathol, 2011. **136**(1): p. 138-44.
6. Mechtersheimer, S., et al., *Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins*. J Cell Biol, 2001. **155**(4): p. 661-73.
7. Montgomery, A.M., et al., *Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3*. J Cell Biol, 1996. **132**(3): p. 475-85.
8. Zander, H., et al., *Circulating levels of cell adhesion molecule L1 as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor patients*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 189:1-7.
9. Fogel, M., et al., *L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas*. Lancet, 2003. **362**(9387): p. 869-75.
10. Andre, T., et al., *Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial*. (1527-7755 (Electronic)).
11. Rathjen, F.G. and M. Schachner, *Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion*. Embo j, 1984. **3**(1): p. 1-10.
12. Martini, R. and M. Schachner, *Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve*. J Cell Biol, 1988. **106**(5): p. 1735-46.
13. Kamiguchi, H., *The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1*. Mol Neurobiol, 2003. **28**(3): p. 219-28.
14. Takeda, Y., et al., *The roles of cell adhesion molecules on the formation of peripheral myelin*. Keio J Med, 2001. **50**(4): p. 240-8.
15. Dihne, M., et al., *A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation*. J Neurosci, 2003. **23**(16): p. 6638-50.
16. Kenwrick, S., A. Watkins, and E. De Angelis, *Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(6): p. 879-86.
17. Blackmore, M. and P.C. Letourneau, *L1, beta1 integrin, and cadherins mediate axonal regeneration in the embryonic spinal cord*. J Neurobiol, 2006. **66**(14): p. 1564-83.
18. Lemmon, V., K.L. Farr, and C. Lagenaur, *L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism*. Neuron, 1989. **2**(6): p. 1597-603.
19. Kuhn, T.B., et al., *Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4)*. J Cell Biol, 1991. **115**(4): p. 1113-26.
20. Friedlander, D.R., et al., *The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan*

- neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth.* J Cell Biol, 1994. **125**(3): p. 669-80.
21. Kowitz, A., et al., *Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes.* Eur J Immunol, 1992. **22**(5): p. 1199-205.
 22. Kujat, R., et al., *Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract.* Histochem Cell Biol, 1995. **103**(4): p. 311-21.
 23. Helbert, M.J., M.E. Dauwe Se Fau - De Broe, and M.E. De Broe, *Flow cytometric immunodissection of the human distal tubule and cortical collecting duct system.* (0085-2538 (Print)).
 24. Dahme, M., et al., *Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system.* Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 346-9.
 25. Cohen, N.R., et al., *Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1.* Curr Biol, 1998. **8**(1): p. 26-33.
 26. Fransen, E., et al., *L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns.* Hum Mol Genet, 1998. **7**(6): p. 999-1009.
 27. Djabali, M., et al., *The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man.* Genomics, 1990. **7**(4): p. 587-93.
 28. Salinas, S., et al., *Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms.* Lancet Neurol, 2008. **7**(12): p. 1127-38.
 29. Jouet, M., et al., *New domains of neural cell-adhesion molecule L1 implicated in X-linked hydrocephalus and MASA syndrome.* Am J Hum Genet, 1995. **56**(6): p. 1304-14.
 30. Rosenthal, A., M. Jouet, and S. Kenwrick, *Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus.* Nat Genet, 1992. **2**(2): p. 107-12.
 31. Wallace, A.S., et al., *L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development.* Neurogastroenterol Motil, 2011. **23**(11): p. e510-22.
 32. Linnemann, D. and E. Bock, *Expression of the cell adhesion molecules N-CAM and L1 in B16 melanoma cells.* Med Biol, 1986. **64**(6): p. 345-9.
 33. Geismann, C., et al., *Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer.* Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4517-26.
 34. Hai, J., et al., *L1 Cell Adhesion Molecule Promotes Tumorigenicity and Metastatic Potential in Non-Small-Cell Lung Cancer.* Clin Cancer Res, 2012.
 35. Zecchini, S., et al., *The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium.* Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 1110-8.
 36. Shtutman, M., et al., *Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells.* Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11370-80.
 37. Allory, Y., et al., *The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1190-7.
 38. Thies, A., et al., *Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma.* Eur J Cancer, 2002. **38**(13): p. 1708-16.
 39. Talantov, D., et al., *Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7234-42.
 40. Zhang, H., et al., *HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs.* Oncogene, 2011.
 41. Schafer, H., et al., *TGF-beta1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human*

- intestinal epithelial cells*. *Oncogene*, 2012.
42. Stoeck, A., et al., *L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells*. *Gynecol Oncol*, 2007. **104**(2): p. 461-9.
 43. Novak-Hofer, I., et al., *Antibodies directed against L1-CAM synergize with Genistein in inhibiting growth and survival pathways in SKOV3ip human ovarian cancer cells*. *Cancer Lett*, 2008. **261**(2): p. 193-204.
 44. Schroder, C., et al., *Expression and prognostic value of L1-CAM in breast cancer*. *Oncol Rep*, 2009. **22**(5): p. 1109-17.
 45. Ben Ze'ev, A. *The many functions of the L1-cell adhesion molecule (L1-CAM) in cancer cells*. Homepage Weizmann Institute of Science, Department of molecular cell biology [website] 2011 22.06.2011; Available from: <http://www.weizmann.ac.il/mcb/Avri/research>.
 46. Gavert, N., et al., *L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers*. *J Cell Biol*, 2005. **168**(4): p. 633-42.
 47. Hall, H. and J.A. Hubbell, *Matrix-bound sixth Ig-like domain of cell adhesion molecule L1 acts as an angiogenic factor by ligating alphavbeta3-integrin and activating VEGF-R2*. *Microvasc Res*, 2004. **68**(3): p. 169-78.
 48. Roring, M. and T. Brummer, *Aberrant B-Raf signaling in human cancer -- 10 years from bench to bedside*. *Crit Rev Oncog*, 2012. **17**(1): p. 97-121.
 49. Gelman, M.S., et al., *Identification of cell surface and secreted proteins essential for tumor cell survival using a genetic suppressor element screen*. *Oncogene*, 2004. **23**(49): p. 8158-70.
 50. Sebens Muerkoster, S., et al., *Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(19): p. 2759-68.
 51. Gavert, N., et al., *L1-mediated colon cancer cell metastasis does not require changes in EMT and cancer stem cell markers*. *Mol Cancer Res*, 2011. **9**(1): p. 14-24.
 52. Gavert, N., et al., *Nuclear factor-kappaB signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 12): p. 2135-43.
 53. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. *Genes Dev*, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
 54. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. *Science*, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
 55. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. *Nature*, 1999. **398**(6726): p. 422-6.
 56. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5522-7.
 57. Wielenga, V.J., et al., *Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(2): p. 515-23.
 58. Gavert, N., et al., *L1-CAM in cancerous tissues*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. **8**(11): p. 1749-57.
 59. Brabletz, T., et al., *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10356-61.
 60. Brabletz, T., et al., *beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(4): p. 1033-8.
 61. Gavert, N., et al., *Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis*. *Cancer Res*, 2007. **67**(16): p. 7703-12.
 62. Endreseth, B.H., et al., *Rectal cancer in the young patient*. *Dis Colon Rectum*, 2006. **49**(7): p. 993-1001.
 63. O'Connell, J.B., et al., *Do young colon cancer patients have worse outcomes?* *World J Surg*, 2004. **28**(6): p. 558-62.

64. Quah, H.M., et al., *Young age influences treatment but not outcome of colon cancer*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(10): p. 2759-65.
65. Anders, C.K., et al., *Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression*. J Clin Oncol, 2008. **26**(20): p. 3324-30.
66. Roy, S. and A.P. Majumdar, *Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: Genetic and Epigenetic Changes*. J Stem Cell Res Ther, 2012. **Suppl 7**(6).
67. Aleksandrova, K., et al., *Adult weight change and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Eur J Cancer, 2013.
68. Ma, Y., et al., *Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies*. (1932-6203 (Electronic)).
69. Sanchez, N.F., et al., *Physical activity reduces risk for colon polyps in a multiethnic colorectal cancer screening population*. (1756-0500 (Electronic)).
70. Keshk, W.A., et al., *Fatty acid synthase/oxidized low-density lipoprotein as metabolic oncogenes linking obesity to colon cancer via NF-kappa B in Egyptians*. (1559-131X (Electronic)).
71. Vetvik, K.K., et al., *Globular adiponectin and its downstream target genes are up-regulated locally in human colorectal tumors: ex vivo and in vitro studies*. (1532-8600 (Electronic)).
72. Liebig, C., et al., *Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5131-7.
73. Ueno, H., et al., *Characterization of Perineural Invasion As a Component of Colorectal Cancer Staging*. Am J Surg Pathol, 2013. **37**(10): p. 1542-1549.
74. Goldstein, M.J. and E.P. Mitchell, *Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer*. Cancer Invest, 2005. **23**(4): p. 338-51.
75. Eche, N., et al., *[Standards, options and recommendations for tumor markers in colorectal cancer]*. Bull Cancer, 2001. **88**(12): p. 1177-206.
76. Wittekind CH, M.H., Bootz F., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. 6 ed. 2002, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer.
77. (JSCCR), J.S.f.C.o.C.o.t.C.a.R., *Japanese Classification of Colorectal Carcinoma*. 1st English Edition ed. 1997, Tokyo: Kanehara & Co.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselwege von L1-CAM	10
Abbildung 2: HE-Färbung und L1-CAM Immunhistochemie.....	15
Abbildung 3: Boxplot Alter der Patienten bei Operation bezogen auf die L1-CAM Expression im Primärtumor.....	18
Abbildung 4: L1-CAM Expression unterschieden nach Geschlecht der Patienten	19
Abbildung 5: BMI der Patienten nach L1-CAM Expression	20
Abbildung 6: L1-CAM Expression entsprechend der Tumortiefenausdehnung	21
Abbildung 7: Perineuralscheideninfiltration in Abhängigkeit der L1-CAM Expression ..	21
Abbildung 8: Lymphknotenmetastasierung nach TNM-Klassifikation und zugehörige L1-CAM Expression im Primärtumor.....	22
Abbildung 9: L1-CAM Expression bezogen auf den Lymphknotentumorbefall	23
Abbildung 10: L1-CAM Expression und Fernmetastasierung.....	24
Abbildung 11: L1-CAM-Expression nach UICC-Tumorstadium	25
Abbildung 12: L1-CAM Expression nach WHO-Grading des Primärtumors	26
Abbildung 13: L1-CAM Expression nach Tumorregressionsgrad nach JSCCR bei neoadjuvant therapierten Patienten	26
Abbildung 14: L1-CAM Expression im Kolon- und Rektumkarzinom.....	27
Abbildung 15: L1-CAM Serumkonzentration.....	28
Abbildung 16: L1-CAM Serumkonzentration einer gesunden Vergleichsgruppe	29
Abbildung 17: Serumkonzentration L1-CAM unter und über dem Alter von 65 Jahren	30
Abbildung 18: Serumkonzentration L1-CAM entsprechend des Lymphknotenbefalls nach TNM-Klassifikation	31
Abbildung 19: ROC-Kurve der Serumkonzentrationen von L1-CAM mit und ohne Lebermetastasierung	32
Abbildung 20: ROC-Kurve der Serumkonzentration von CEA mit und ohne Lebermetastasierung	32
Abbildung 21: L1-CAM Serumkonzentration im Vergleich mit und ohne neoadjuvante Therapie	33
Abbildung 22: L1-CAM Serumkonzentration und L1-CAM Immunhistologie	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alter und Geschlecht sowie Tumorstadium und Therapie unterschieden nach Tumorlokalisation	13
Tabelle 2: Alter der Patienten bei Operation nach L1-CAM Expression.....	19
Tabelle 3: L1-CAM Expression entsprechend der Tumortiefenausdehnung	20
Tabelle 4: L1-CAM Expression und Fernmetastasierung	23
Tabelle 5: L1-CAM-Expression nach UICC-Tumorstadium	25
Tabelle 6: L1-CAM Expression im Kolon- und Rektumkarzinom	28
Tabelle 7: L1-CAM Serumkonzentration	28
Tabelle 8: L1-CAM Serumkonzentration der gesunden Vergleichsgruppe und der Patienten	29
Tabelle 9: Serumkonzentration L1-CAM bei Patienten mit und ohne Lebermetastasen.....	31
Tabelle 10: L1-CAM Serumkonzentration im Vergleich mit und ohne neoadjuvante Therapie	33
Tabelle 11: L1-CAM Serumkonzentration und L1-CAM Immunhistologie	34

9. Anlagen

TNM-Klassifikation der UICC für das kolorektale Karzinom (UICC 2002) [76]

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ ¹
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen ^{2,3} und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
Anmerkungen:	
¹ Tis liegt vor, wenn Tumorzellen innerhalb der Basalmembran der Drüsen (intraepithelial) oder in der Lamina propria (intramukös) nachweisbar sind, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa feststellbar ist.	
² Direkte Ausbreitung in T4 schließt auch die Infiltration anderer Segmente des Kolorektrums auf dem Weg über die Serosa ein, z. B. die Infiltration des Sigmas durch ein Zölkarkarzinom.	
³ Ein Tumor, der makroskopisch an anderen Organen oder Strukturen adhären ist, wird als T4 klassifiziert. Ist bei der histologischen Untersuchung in den Adhäsionen kein Tumorgewebe nachweisbar, soll der Tumor als pT3 klassifiziert werden. (siehe auch folgende Abbildungen)	
N - Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1–3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten.
Anmerkung:	
Ein Tumorknötchen im perikolischem oder perirektalen Fettgewebe ohne histologischen Anhalt für Reste eines Lymphknotens wird in der pN-Kategorie als regionäre Lymphknotenmetastase klassifiziert, wenn die Form und glatte Kontur eines Lymphknotens vorliegt. Wenn das Tumorknötchen eine irreguläre Kontur aufweist, soll es in der pT-Kategorie klassifiziert und auch als V1 (mikroskopische Veneninvasion) oder, falls es makroskopisch erkennbar ist, als V2 verschlüsselt werden, weil es dann sehr wahrscheinlich ist, dass es eine Veneninvasion darstellt.	
M - Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

UICC-Tumorstadien für das kolorektale Karzinom [76]

Stadium Ia	Beschränkung der Tumorinfiltration auf die Mukosa und Tela submucosa
Stadium Ib	Beschränkung der Tumorinfiltration bis in die Tunica muscularis propria
Stadium II	T3 oder T4 ohne Lymphknotenmetastasierung
Stadium III	Lymphknotenmetastasierung
Stadium IV	Vorhandensein von Fernmetastasen

Differenzierungsgrad des Tumors nach WHO [76]

Grad 1 (G1)	gut differenziertes bösartiges Gewebe („low-grade“), hohe Übereinstimmung mit Ursprungsgewebe
Grad 2 (G2)	mäßig differenziertes bösartiges Gewebe
Grad 3 (G3)	schlecht/niedrig differenziertes bösartiges Gewebe
Grad 4 (G4)	nicht differenziertes bösartiges Gewebe (undifferenziert bzw. anaplastisch) („high-grade“). Der Tumor kann manchmal nicht mehr oder nur aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen einem bestimmten Ausgangsgewebe zugeordnet werden.
Grad 9 (G9)	Grad der Differenzierung ist nicht zu beurteilen

Grading des Regressionsgrades nach neoadjuvanter Therapie entsprechend der Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR 1997) [77]

Grad 0	kein Effekt	weder Nekrose noch zelluläre oder strukturelle Veränderungen nachweisbar
Grad 1	geringe Regression	Grad 1 a = Nekrose oder Verschwinden des Tumors in weniger als 1/3 der Läsion oder nur zellulärer oder strukturelle Veränderungen. Grad 1 b = Nekrose oder Verschwinden des Tumors in weniger als 2/3 der Läsion, aber vitaler Tumor noch vorhanden.
Grad 2	mäßiggradige Regression	Nekrose oder Verschwinden des Tumors in mehr als 2/3 der Läsion, aber vitaler Tumor noch vorhanden
Grad 3	starke Regression	gesamte Läsion nekrotisch und/oder durch Fibrose mit oder ohne granulomatöse Reaktion ersetzt, keine vitalen Tumorzellen

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei all denjenigen, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit anzufertigen und mich bei der Durchführung der Untersuchungen geholfen haben. Namentlich sind das Prof. Dr. Arne Dietrich, der die Proben der Patienten zur Verfügung gestellt hat, Frau Dr. Anne Kathrin Höhn, die mich sehr bei der Durchführung der immunhistologischen Färbungen unterstützt hat und Frau Dr. Nadine Schlichting, welche mir bei der Durchführung der ELISAs im Labor zur Seite gestanden hat.

Für die Hilfestellung bei der Ausarbeitung der Fragestellung sowie die Zurverfügungstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung der Untersuchungen mittels ELISA bedanke ich mich bei Dr. Dr. Andreas Oberbach und für die fortwährende Betreuung sowie die hilfreichen Ratschläge zur Optimierung der Arbeit danke ich Dr. Robin Wachowiak sehr.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulf Bühligen für die Betreuung der Arbeit als Doktorvater.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mich lebenslang bei allem unterstützt haben, was ich getan habe, so auch bei der Erarbeitung dieser Dissertation.